

Nachweis
von Chloramphenicol-Rückständen
in Kuhmilch mittels
Hochdruckflüssigkeitschromatographie

Renate Lidl

Diss. München
1984

Aus dem Tiergesundheitsdienst Bayern
Bereich Lebensmittelhygiene
Leitung: Prof. Dr. W. Gedek

vorgelegt über:
Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

NACHWEIS VON CHLORAMPHENICOL-RÜCKSTÄNDEN
IN KUHMILCH MITTELS
HOCHDRUCKFLÜSSIGKEITSCHROMATOGRAPHIE

I n a u g u r a l - D i s s e r t a t i o n

zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

von
Renate Lidl
aus
Murnau

München 1983

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan: Prof. Dr. W. Leidl

Referent: Prof. Dr. G. Terplan

Korreferent: Priv. Doz. Dr. Dr. habil. J. Wittmann

Tag der Promotion: 24. Februar 1984

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1. EINLEITUNG	1
2. SCHRIFTTUM	2
2.1 Zur Pharmakokinetik von Chloramphenicol beim Wiederkäuer	2
2.1.1 Chloramphenicol und seine Metaboliten	2
2.1.2 Orale Verabreichung	4
2.1.3 Intramuskuläre Verabreichung	5
2.1.4 Intramammäre Verabreichung	8
2.1.5 Plasmaprotein-Bindung	9
2.1.6 Verteilung in Geweben und Körperflüssig- keiten	9
2.1.7 Metabolisierung und Elimination	11
2.2 Ausscheidung von Chloramphenicol mit der Milch	11
2.2.1 Parenterale Verabreichung	11
2.2.2 Intramammäre und intrauterine Verab- reichung	14
2.3 Mikrobiologischer Nachweis von Chlor- amphenicol-Rückständen in der Milch	17
2.4 Physikalisch-chemischer Nachweis von Chloramphenicol	20
2.4.1 Gaschromatographie	20
2.4.2 Hochdruckflüssigkeitschromatographie	22
2.4.3 Weitere physikalisch-chemische Nachweis- methoden für Chloramphenicol in Milch	29

3. EIGENE UNTERSUCHUNGEN

3.1	Material	33
3.1.1	Chloramphenicol-Präparate	33
3.1.2	Testsubstanzen	33
3.1.3	Milchproben	34
3.2	Methodik	34
3.2.1	Isolierung von Chloramphenicol aus der Milch	34
3.2.2	Qualitative und quantitative Bestimmung von Chloramphenicol	35
3.2.3	Verabreichung von Chloramphenicol an Versuchskühe und Gewinnung der Milch- proben	36
3.3	Versuche und Versuchsergebnisse	37
3.3.1	Extraktionsverfahren bei künstlich kontaminierter Milch	37
3.3.2	HPLC-Bedingungen und Säulenparameter	39
3.3.3	Qualitative und quantitative Auswertung des Chromatogramms	43
3.3.4	Wiederfindungsraten	47
3.3.5	Reagenzienblindwerte	50
3.3.6	Interferenzen mit anderen Antibiotika	50
3.3.7	Einfluß von β -Glucuronidase auf den Chloramphenicol-Nachweis	50
3.3.8	Ausscheidung von Chloramphenicol mit der Milch nach intramuskulärer Applikation	52
3.3.9	Ausscheidung von Chloramphenicol mit der Milch nach intrazisternaler Applikation	54
3.3.10	Ausscheidung von Chloramphenicol mit der Milch nach intrauteriner Applikation	62
3.3.11	Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen	63

4. DISKUSSION

64

5. ZUSAMMENFASSUNG

68

6. SUMMARY

70

7. LITERATURVERZEICHNIS

72

Meine Aufgabe war zu untersuchen, ob bei Nachweis von Chlorocephalosporin nach Extraktion aus der Milch mit diesem System die niedrigen Konzentrationen beobachtet werden können und ob diese Methode für die routinemäßige Wirkstoffanalyse geeignet ist.



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1. EINLEITUNG

Chloramphenicol ist ein in der Tiermedizin häufig angewendetes Breitspektrumantibiotikum von hohem therapeutischem Wert. In der Humanmedizin wird eine Begrenzung des Einsatzes von Chloramphenicol auf bestimmte Krankheitsfälle wie Meningitis und Typhus empfohlen, da dieses Antibiotikum als eine der möglichen Ursachen für die Auslösung der aplastischen Anämie beim Menschen verantwortlich gemacht wird. Die Behandlung von Tieren, die der Gewinnung von Lebensmitteln dienen, wird aus hygienischer Sicht kritisch gewertet, da Befürchtungen bestehen, daß auch Chloramphenicol-Rückstände in Lebensmitteln - etwa bei Nichteinhaltung der Wartezeit - zu gesundheitlichen Schäden beim Konsumenten führen können. In der Bundesrepublik Deutschland wurden bereits Vorschläge zur Beschränkung der Anwendung von Chloramphenicol bei lebensmittelliefernden Tieren und zur Festsetzung einer Höchstmenge für dieses Antibiotikum gemacht. Unter diesem Aspekt erscheinen Untersuchungen über einen empfindlichen und praktikablen Nachweis von Chloramphenicol in Lebensmitteln dringlich. Die normalerweise benützten mikrobiologischen Nachweismethoden für Antibiotika in Körperflüssigkeiten und tierischen Geweben sind für Chloramphenicol zu wenig empfindlich und nicht spezifisch. In letzter Zeit wurde die Hochleistungsflüssigkeitschromatographie als schnelle, genügend spezifische und empfindliche Methode zur Bestimmung von Chloramphenicol in biologischem Material, vornehmlich in Serum und Plasma, herausgestellt.

Meine Aufgabe war zu untersuchen, ob der Nachweis von Chloramphenicol nach Extraktion aus der Milch mit diesem System im niedrigen Konzentrationsbereich möglich ist und ob diese Methode für die routinemäßige Rückstandsanalytik brauchbar ist.



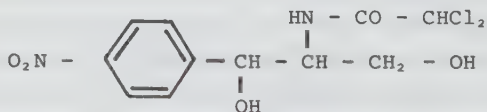
2. S C H R I F T T U M

2.1 ZUR PHARMAKOKINETIK VON CHLORAMPHENICOL BEIM WIEDERKÄUER

2.1.1 C h l o r a m p h e n i c o l u n d s e i n e M e t a b o l i t e n

Chloramphenicol (CAP) wurde 1947 aus *Streptomyces venezuelae* isoliert. Nach Aufklärung der chemischen Struktur im Jahre 1949 gelang sehr rasch die Synthese. Seit etwa 1950 wird CAP ausschließlich synthetisch hergestellt (WALTER und HEILMEYER, 1975).

CAP ist D-(-)-threo-2-(Dichlor-acetamido)-1-(p-Nitrophenyl)-propan-1,3-diol mit folgender Strukturformel:



Im menschlichen und tierischen Organismus wird CAP zum größten Teil metabolisiert. An der biogenen Bildung von Metaboliten können mikrobielle und animalische Enzyme beteiligt sein. Die mikrobielle Biotransformation von CAP erfolgt vor allem im Verdauungskanal durch Enzyme von Enterobakterien. Die Bildung animalischer Metaboliten geschieht durch mikrosomale Enzyme, die in der Leber und diversen anderen Organen praktisch aller Vertebraten vorkommen.

Hauptmetabolit ist das durch mikrosomale Glucuronyltransferasen an Glucuronsäure konjugierte CAP (CAPG). Ein weiterer Inaktivierungsmechanismus ist die Reduktion der Nitrogruppe sowohl durch Nitroreduktasen der Pansenflora von Wiederkäuern als auch durch mikrosomale Nitroreduktasen unter Bildung von Amino-CAP (ACAP). Andere Abbaumöglichkeiten stellen die Hydrolyse von CAP zum Nitro-Amino-Pro-pandiol (NAPD) durch mikrobielle und animalische Amidasen und die Dehalogenierung zum Hydroxy-Amphenicol (HAP) durch mikrosomale Monooxygenasen dar. Auch Acetyltransferasen von Enterobakterien und Glutathion-S-Transferasen im Cytosol diverser Organe metabolisieren CAP zu mikrobiologisch in-aktiven Verbindungen (SCHMID, 1983).

Abb. 1 veranschaulicht die wichtigsten Schritte der Metabolisierung von CAP.

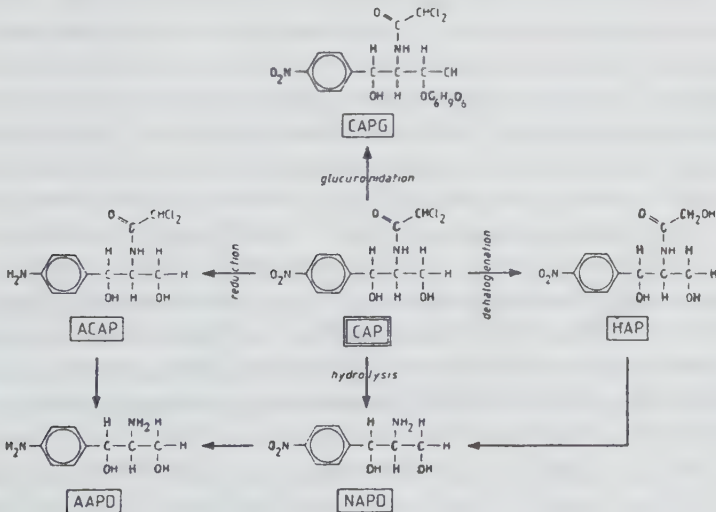


Abb. 1: Metabolismus von CAP (nach GLAZKO, 1966)

2.1.2 O r a l e V e r a b r e i c h u n g

Während beim Monogastrier nach oraler Applikation von CAP eine rasche und vollständige Resorption im Gastrointestinaltrakt stattfindet (GLAZKO et al., 1949 b; GLAZKO, 1966), erfolgt beim erwachsenen Wiederkäuer keine Resorption. DE CORTE-BAETEN und DEBACKERE (1975) konnten weder beim Rind noch beim Schaf CAP im Plasma nach oraler Verabreichung nachweisen. Dasselbe gilt für Ziegen (DAVIS et al., 1972). SISODIA et al. (1973) stellten fest, daß CAP nach oraler Gabe an Kälber kaum resorbiert wird und auch nach sehr hohen Dosen keine therapeutisch wirksamen Blutspiegel erreicht werden. Dagegen werden bei nicht ruminierenden Kälbern nach oraler Verabreichung meßbare Serumkonzentrationen erreicht (DE BACKER et al., 1978).

Da CAP bei Pansen-pH-Werten von 5 - 7 ziemlich stabil ist, wird von SISODIA et al. (1973) angenommen, daß die Zerstörung von CAP im Pansen durch bestimmte Mikroorganismen verursacht wird, die wahrscheinlich resistent gegenüber CAP sind. Bei oraler Gabe hat man eine Hemmung von empfindlichen Mikroorganismen und ein selektives Überleben von resistenten Bakterien im Pansen zu erwarten. Entgegen dieser Auffassung steht die Ansicht von DE CORTE-BAETEN und DEBACKERE (1978), die die Zerstörung von CAP im Pansen als echte Metabolisierung und nicht als eine Inaktivierung durch resistente Bakterien ansehen. Bei in vitro-Experimenten mit Panseninhalt vom Schaf erfolgte in den Fraktionen mit Ziliaten eine schnelle Reduktion der aromatischen Nitrogruppe von CAP zum Arylamin. Es wird gefolgert, daß CAP beim erwachsenen Wiederkäuer durch die Pansenmikrofauna schneller metabolisiert wird, als es resorbiert wird, und daß deshalb nach oraler Verabreichung keine meßbaren Blutspiegel erreicht werden.

Im Widerspruch zu den vorstehenden Ergebnissen stehen die Resultate von GORZELEWSKA und JUSZKIEWICZ (1961), die nach oraler Gabe hohe CAP-Konzentrationen im Serum von Kühen und Schafen, und auch in der Milch von Kühen feststellten.

2.1.3 I n t r a m u s k u l ä r e V e r a b r e i c h u n g

Das pharmakokinetische Verhalten von CAP nach intramuskulärer Applikation ist u.a. von der pharmazeutischen Zubereitung abhängig. Für die parenterale Verabreichung von CAP stehen CAP-Base in organischen Lösungsmitteln gelöst, und das CAP-Na-Succinat zur Verfügung. CAP-Na-Succinat ist ein Ester, der als solcher antimikrobiell unwirksam ist und erst nach der Hydrolyse im Organismus aktives CAP freisetzt (WALTER und HEILMEYER, 1975).

NOUWS und ZIV (1979) bestimmten die CAP-Konzentrationen im Serum von Kühen, Schafen und Ziegen, die mit sieben verschiedenen Präparaten (6 mal CAP-Base in verschiedenen organischen Lösungsmitteln, einmal CAP-Na-Succinat) parenteral behandelt wurden. Die Bioverfügbarkeit aller Präparate, die CAP-Base enthielten, war nach intramuskulärer Verabreichung gering. Die absolute Bioverfügbarkeit lag bei der Injektion in zwei Halsseiten zwischen 51% und 80,5% und war geringer, wenn eine entsprechende Dosis in eine Halsseite verabreicht wurde. Die Anzahl der Injektionsstellen ist bei der CAP-Base mitbestimmend, ob Serumspiegel in therapeutischer Höhe erzielt werden. Nach Injektion von CAP-Base (30 mg/kg KGW) in zwei Halsseiten lagen die maximalen Serumkonzentrationen (C_{max}) bei allen Präparaten mit durchschnittlich 9,8 $\mu\text{g/ml}$ ziemlich gleich. Die Zeit, in der maximale Serumspiegel erreicht wurden, variierte bei drei Präparaten von 131 min bis 249 min und wurde bei einem Präparat erst sechs Stunden später erreicht. Die Plasmahalbwertszeiten lagen zwischen 33 min und

62 min, die Eliminationshalbwertszeiten aus dem Plasma zwischen 242 min und 448 min. Im Vergleich zu CAP-Base enthaltenden Präparaten erfolgte nach intramuskulärer Injektion von CAP-Na-Succinat (50 mg/kg KGW) an Schafe eine rasche Resorption und eine sehr rasche Elimination aus dem Serum ($T_{1/2}$ 5,3 min), wobei C max. mit 30 µg/ml in 21 min erreicht wurde und die Eliminationshalbwertszeit 111 min betrug.

CAP-Serumkonzentrationen, die nach Behandlung von Schafen mit CAP-Base auf chemischem Weg ermittelt wurden, waren 20% - 46% höher als mikrobiologisch bestimmte Werte. Während der ersten 30 min nach der Behandlung mit dem CAP-Ester waren die Serumkonzentrationen bei chemischer Bestimmung doppelt so hoch wie nach mikrobiologischer Bestimmung, nach 120 min waren die chemisch bestimmten Werte wie bei CAP-Base 20% - 40% höher. Daraus kann gefolgert werden, daß in vivo eine rasche Hydrolyse des CAP-Esters stattfindet. Das Hydrolysemaximum ist beim Schaf 120 min nach intramuskulärer Injektion und bei der Ziege nach einer erheblich längerer Zeit.

DAVIS et al. (1972) hingegen stellten fest, daß nach intramuskulärer Verabreichung von CAP-Na-Succinat (22 mg/kg KGW) an Ziegen eine schnelle Resorption erfolgt und maximale Serumkonzentrationen von 6 - 8 µg/ml schon in 30 min erreicht werden. Nach Injektion der gleichen Dosis CAP-Base konnte im Plasma von Ziegen kein CAP nachgewiesen werden.

ZIV et al. (1973) ermittelten nach einer einmaligen intramuskulären Injektion von CAP-Na-Succinat (50 mg/kg KGW) im Serum von Milchkühen eine sechsmal höhere Konzentration des Medikaments als nach Verabreichung einer äquivalenten Dosis von CAP-Base. Der Ester erreichte früher maximale Serumkonzentrationen (25 µg/ml nach 1 Std.) und wurde schneller als CAP-Base aus dem Serum eliminiert. Aus dem schnellen, initialen Ansteigen der CAP-Konzentrationen im Serum und dem ex-

ponentiellen Abfall der Konzentration während fünf Stunden nach Erreichen der maximalen Serumkonzentration wird auch hier geschlossen, daß die Hydrolyse des CAP-Esters zumindest beim Wiederkäuer schnell stattfindet. Die relativ geringen Serumkonzentrationen, die mit CAP-Base nach intramuskulärer Injektion erreicht wurden (C max. 3,8 µg/ml nach 3-4 Std.) sind auf die extrem geringe Wasserlöslichkeit des CAP zurückzuführen. Der Ester hingegen ist gut wasserlöslich. Auch die Verabreichung von CAP in organischen Lösungsmitteln, wie Propylenglykol oder Acetyldimethylamin, beschleunigt die Resorption aus der Injektionsstelle nicht.

Die intramuskuläre Verabreichung von CAP-Na-Succinat führte beim Wiederkäuer zu meßbaren Blutspiegeln, jedoch bestanden tierartliche Unterschiede bezüglich der maximalen Serumkonzentrationen und des zeitlichen Verlaufs von Resorption und Elimination. Übereinstimmend berichteten DE CORTE-BAETEN und DEBACKERE (1975), SISODIA et al. (1973) und GORZELEWSKA und JUSZKIEWICZ (1961), daß nach intramuskulärer Injektion sowohl die Resorption von CAP als auch die Elimination aus dem Blut beim Schaf viel schneller vor sich geht als beim Rind. Bei Schafen wurden 2-3 Stunden nach intramuskulärer Injektion signifikant höhere Plasmaspiegel als bei Rindern erreicht, und signifikant niedrigere Werte von der 6.-9. Stunde ab. Nach intramuskulärer Gabe von CAP-Na-Succinat (10 mg/kg KGW) wurde bei Rindern nach 3-6 Stunden ein maximaler Mittelwert von 1,7 µg/ml und bei Schafen nach 1 Stunde ein solcher von 4,1 µg/ml erreicht. Die biologische Halbwertszeit wurde für das Rind mit 4,7 Stunden, für das Schaf mit 1,3 Stunden (DE CORTE-BAETEN und DEBACKERE, 1975) und für die Ziege mit 2 Stunden (DAVIS et al., 1972) angegeben.

2.1.4 Intramammäre Verabreichung

Arzneimittel werden vom Euter durch passive Diffusion resorbiert. Von CAP kann eine schnelle Resorption angenommen werden, weil es ein nicht-ionisiertes, lipophiles Molekül mit begrenzter Bindungsaffinität zu Milchproteinen und Eutergewebsproteinen darstellt. Die für die Resorption zur Verfügung stehende Oberfläche im Euter ist groß und die gute Durchblutung des Organs unterstützt eine rasche Resorption. CAP wird im Vergleich zu über 30 anderen Antibiotika am schnellsten von der Milchdrüse resorbiert. Die Fähigkeit des Euters, verschieden große Mengen an CAP vollständig zu resorbieren, zeigt die Feststellung, daß CAP-Serumspiegel dosisabhängig sind und daß CAP-Milchspiegel 12 Stunden nach intramammärer Infusion im wesentlichen dosisunabhängig sind (ZIV und SULMAN, 1975).

NOUWS und ZIV (1982) bestimmten CAP-Konzentrationen in Milch und Serum von Milchkühen nach intramammärer und intramuskulärer Applikation von 1-30 g CAP-Base/Kuh. Die maximalen Serumkonzentrationen waren nach intramammärer Infusion höher und wurden schneller erreicht als die entsprechenden Serumwerte nach intramuskulärer Injektion gleicher Dosen CAP. Das CAP verschwand nach intramammärer Infusion auch schneller aus dem Serum. Nach intramammärer Verabreichung von 5 g, 12,5 g und 25 g CAP/Kuh waren die maximalen Serumkonzentrationen 6,1, 16,2 und 37,4 µg/ml, während nach intramuskulärer Injektion von 25 g CAP/Kuh die maximale Serumkonzentration nur 4 µg/ml betrug. Aus den Ergebnissen dieser Studie kann ebenfalls geschlossen werden, daß CAP vom Euter sehr schnell resorbiert wird. Abhängig von der physiologischen Aktivität des betreffenden Viertels war die Resorption zwischen neun und 24 Stunden p.appl. vollständig beendet. Die Resorptionshalbwertszeit wurde bei intakten Vierteln mit durchschnittlich 57 min, bei Vierteln mit verminderter Milchproduktion mit durchschnittlich 125 min angegeben.

LEE (1981) gab die Resorptionshalbwertszeit von CAP nach intramammärer Infusion mit weniger als einer halben Stunde an. Eine rasche Resorption beweisen die hohen Blutspiegel, die der Untersucher schon 15 min nach der Euterbehandlung feststellte. Die Bioverfügbarkeit von CAP nach intramammärer Verabreichung soll nach Meinung des Autors sogar größer sein als nach intravenöser Injektion.

2.1.5 P l a s m a p r o t e i n - B i n d u n g

Die Bindungskapazität der Plasmaproteine für CAP variiert bei den verschiedenen Spezies. CAP wird bei Ziegen in begrenztem Umfang (30%) an Plasmaproteine gebunden (DAVIS et al., 1973). Beim Kalb sind 60% des CAP an Proteine gebunden (SISODIA et al., 1973). PILLOUD (1973) gab die Proteinbindung für Kühe mit 45% - 50% an.

Alle Untersucher stimmen darin überein, daß das Ausmaß der Proteinbindung unabhängig von der Konzentration des Arzneimittels im Plasma ist.

2.1.6 V e r t e i l u n g i n G e w e b e n u n d K ö r p e r f l ü s s i g k e i t e n

CAP diffundiert beim Rind rasch vom Blut ins Gewebe und verteilt sich weitläufig in extravaskulären Gebieten. Die Konzentration an freiem CAP entspricht überall im Körper in etwa der Konzentration im Plasma, wenn einmal ein Gleichgewicht erreicht ist, ausgenommen im Harn, wo CAP in 200-250facher Konzentration vorliegt (PILLOUD, 1973).

SISODIA et al. (1973) bestimmten zwei Stunden nach intravenöser Infusion (20 mg CAP/kg KGW) die Konzentration an aktivem

CAP in verschiedenen Organen und Körperflüssigkeiten von Kälbern. Die CAP-Konzentrationen in Muskel, Myokard und Gehirn entsprachen der Plasmakonzentration (7,9 - 9,9 µg/ml). CAP passierte die Blut-Hirn-Schranke also schnell. Der Anteil des Antibiotikums in der Zerebrospinalflüssigkeit und der Niere war halb so groß wie im Plasma (4,5 - 4,8 µg/ml). Geringere Konzentrationen lagen in Lunge, Fett, Leber und Milz vor (1,9 - 3,0 µg/ml). Sehr hohe Konzentrationen waren in Harn (280 µg/ml) und Galle (28 µg/ml) zu finden.

NOUWS und ZIV (1978) ermittelten mit einer chemischen Methode, die sowohl aktives CAP als auch Metaboliten erfaßte, daß die Verteilung von metabolisiertem CAP im Gewebe nicht gleichmäßig war. Die Gewebskonzentrationen lagen viel höher und waren persistenter als die Serumspiegel. Sehr hohe Wirkstoffkonzentrationen wurden in Leber und Niere gefunden. Die Werte für Muskel und Galle überstiegen die Plasmakonzentration. CAP wurde beim Wiederkäuer zwar schnell und umfassend metabolisiert, jedoch erfolgte eine relativ langsame Elimination der metabolisierten Muttersubstanz aus dem Gewebe. Gewebeproben, die 18, 46 und 65 Stunden nach der Behandlung untersucht wurden, ließen die Kalkulation der Eliminationsraten von CAP und Metaboliten aus diversen Organen zu. Die Eliminationshalbwertszeit wurde für Muskel mit 13,8, für Niere mit 21,8 und für Leber mit 16,7 Stunden angegeben.

LEE (1981) hingegen vertrat die Auffassung, daß sowohl aktives CAP als auch Abbauprodukte von CAP rasch und vollständig aus Geweben und Körperflüssigkeiten eliminiert werden. 18,5 Stunden nach intravenöser und intramammärer Verabreichung von je 5 g CAP-Base an Milchkühe konnten weder CAP noch seine Metaboliten in größeren Mengen nachgewiesen werden. Die Eliminationshalbwertszeit wurde mit etwa drei Stunden angegeben.

2.1.7 M e t a b o l i s i e r u n g u n d E l i m i n a t i o n

Die Exkretion von CAP erfolgt beim Wiederkäuer in erster Linie über den Harn. Andere Ausscheidungswege wie Galle oder Milch spielen bei der Elimination eine untergeordnete Rolle (PILLOUD, 1973). Für die reale Ausscheidung ist die Konjugation von CAP an Glucuronsäure wesentlich. Im Harn stellt die größte Fraktion glucuronidiertes CAP dar (GLAZKO, 1966). PILLOUD (1973) konnte durch Inkubation von Harn mit Glucuronidase nachweisen, daß im Harn von Kühen 75% des ausgeschiedenen CAP an Glucuronsäure gebunden waren und 25% in freier Form vorlagen.

Aktives CAP wird durch glomeruläre Filtration ausgeschieden, während die inaktiven Metaboliten durch tubuläre Sekretion eliminiert werden (GLAZKO et al., 1949 b).

Das zum Arylamin metabolisierte CAP wurde nach SCHMID (1983) in einem Umfang von 4% - 8% der Gesamtmetaboliten des Harns renal ausgeschieden. GLAZKO (1966) stellte fest, daß die Arylaminbildung speziesabhängig ist und in Abhängigkeit zur Ausscheidung von CAP-Metaboliten durch die Galle steht.

2.2 A U S S C H E I D U N G V O N C H L O R A M P H E N I C O L M I T D E R M I L C H

Die Ausscheidung eines Arzneimittels mit der Milch ist abhängig vom Präparat, der Dosierung und der Applikationsart. Auch die Milchleistung des Tieres sowie individuelle Unterschiede beeinflussen Intensität und Dauer der Ausscheidung (HAMANN, 1973; ZIV et al., 1973).

2.2.1 P a r e n t e r a l e V e r a b r e i c h u n g

Die intramuskuläre Verabreichung von CAP führt zu meßbaren CAP-Rückständen in der Milch. Nach den Untersuchungen von

DE CORTE-BAETEN und DEBACKERE (1976) war der CAP-Gehalt der Milch nie höher als der entsprechende Blutplasmaspiegel. Während der ersten drei Stunden p.appl. waren die Plasmaspiegel signifikant höher. Der Übergang von CAP in die Milchdrüse variierte sehr stark und machte während der ersten zwölf Stunden nach der Injektion zwischen 5% und 90% des entsprechenden Blutspiegels aus. Nach einer Stunde lag die Elimination bei 10% der entsprechenden Plasmakonzentration, nach drei Stunden zwischen 20% und 60%, nach sechs Stunden zwischen 50% und 80% und nach neun und zwölf Stunden zwischen 70% und 90%. Von 12-24 Stunden nach der Injektion waren die Konzentrationen in Milch und Plasma ziemlich gleich. Zwölf Stunden nach einer einmaligen intramuskulären Injektion von CAP (10 mg/kg KGW) bei Milchkühen war CAP in der Milch deutlich nachweisbar, 24 Stunden p.appl. lag der CAP-Gehalt in der Milch gerade noch an der Nachweisgrenze von 0,1 µg/ml.

SISODIA et al. (1973 a) fanden ebenfalls 24 Stunden nach einer einmaligen intramuskulären Verabreichung von CAP (11 mg/kg KGW) nur noch Spuren von CAP in der Milch. 36 Stunden p.appl. wurden keinerlei Rückstände in der Milch gefunden.

Auch WAL et al. (1980) konnten 24 Stunden nach intramuskulärer Gabe von 600 mg CAP an Ziegen bei einer Nachweisgrenze von 0,01 µg/ml kein CAP in der Milch nachweisen.

JACOBS und HANSELAAR (1966) fanden schon sechs Stunden nach der intramuskulären Verabreichung von 10 mg CAP/kg KGW keine Rückstände mehr in der Milch. Die Empfindlichkeit der mikrobiologischen Nachweismethode für CAP betrug allerdings nur 1 µg/ml.

ZIV et al. (1973) stellten fest, daß bei höherer Dosierung von CAP die Ausscheidungsdauer verlängert war. Auch die pharmazeutische Zubereitung beeinflusste die Dauer der Elimina-

tion mit der Milch. Nach der einmaligen intramuskulären Injektion von CAP-Base (50 mg/kg KGW) und vergleichend einer äquivalenten Dosis von CAP-Na-Succinat waren 34 Stunden p. appl. im Falle der CAP-Base noch 1 µg/ml Milch, beim Ester weniger als 0,5 µg/ml Milch nachweisbar. CAP-Base bedingte im Blut und in der Milch vergleichsweise niedrigere Maximalkonzentrationen und wurde aus der Milch langsamer eliminiert als der Ester.

GORZELEWSKA und JUSZKIEWICZ (1961) stellten 24 Stunden nach intramuskulärer Verabreichung von 50 mg CAP/kg KGW an Milchkühe sehr hohe Rückstände in der Milch fest. CAP in wässriger Lösung ergab Gehalte von 12,2 µg/ml Milch, CAP auf öligem Grundlage 15,4 µg/ml Milch.

Bei intravenöser Infusion höherer Dosen CAP stiegen die Milchgehalte, während die Eliminationsdauer nicht verlängert war. 24 Stunden nach intravenöser Gabe von 11 bzw. 22 mg CAP/kg KGW waren nur noch Spuren von CAP in der Milch nachweisbar (SISODIA et al., 1973 a).

ZIV et al. (1973) bestimmten die CAP-Gehalte nach intramuskulärer Verabreichung von CAP-Na-Succinat in der Milch von Schafen vergleichend chemisch und mikrobiologisch. Mit beiden Methoden wurden gleiche Konzentrationen ermittelt, was bedeutet, daß CAP in der Milch nur in der aktiven Form anwesend war. Dies spricht nach Meinung der Autoren für eine nicht-ionische Diffusion von CAP aus dem Blut in die Milch. Weder der unhydrolysierte Ester noch Metaboliten diffundierten leicht in die Milch. Während CAP im Blut zu 44% - 56% an Serumproteine gebunden war, lag es in normaler Milch in ungebundener Form vor.

LAUE et al. (1980) ermittelten die Ausscheidungsdauer von CAP mit der Milch nach subkutaner Verabreichung (2 mal täglich) 15 mg/kg KGW im Abstand von 12 Std. für die Dauer von 3 Tagen).

Die Ausscheidung war erst zwölf Tage nach der letzten Behandlung beendet und erwies sich im Rahmen der gewählten Versuchsanordnung als dosisabhängig. Die Nachweisgrenze betrug bei gaschromatographischer Bestimmung $0,01 \mu\text{g CAP/ml}$ Milch.

2.2.2 Intramammäre und intrauterine Verabreichung

BRUNSCHWILER (1961) untersuchte die Ausscheidung von Antibiotika mit der Milch nach intramammärer Behandlung von Milchkühen mit neun verschiedenen Mastitispräparaten. Die Beschaffenheit der Trägersubstanz eines Präparates war für die Ausscheidungsdauer maßgebend. Eine lange Ausscheidung ergab sich für Präparate mit Zusätzen von Pflanzenölen, Mineralöl, Vaseline und Wachs. Präparate auf wässriger Grundlage, einfache Ölsuspensionen und Medikamente, die Netzmittel enthielten, zeigten eine kürzere Ausscheidungsdauer. Individuelle Unterschiede in der Ausscheidungszeit waren gering. Bereits 24 Stunden nach der intramammären Verabreichung von 500 mg CAP in wässriger Lösung war ebenso wie bei Verabreichung von 500 mg CAP in öligem Suspension bei einer Nachweisgrenze von $0,02 \mu\text{g/ml}$ in der Milch kein CAP nachweisbar.

HAMANN (1973) bestimmte CAP-Konzentrationen in der Milch nach Instillation von 2 g CAP-Base in ein Euterviertel. Sechs Stunden nach der Behandlung konnten in der Milch aus den behandelten Vierteln $800 \mu\text{g/ml}$, zwölf Stunden danach $4 \mu\text{g/ml}$ und 24 Stunden danach $0,01 \mu\text{g/ml}$ nachgewiesen werden. Mit Hilfe des gaschromatographischen Nachweises konnte das mit der Milch ausgeschiedene CAP sechs Stunden länger verfolgt werden als mit parallel durchgeführten mikrobiologischen Standardverfahren.

WAL et al. (1980) ermittelten 24 Stunden nach intramammärer Verabreichung von 600 mg CAP an Ziegen eine Konzentration von 0,026 µg/ml in der Milch. 32 Stunden nach der Behandlung waren keine Rückstände mehr nachweisbar.

LEE (1981) konnte 30 Minuten nach der Behandlung eines Euterviertels mit 5 g CAP in der Milch der unbehandelten Viertel CAP-Konzentrationen zwischen 0,34 und 0,68 µg/ml feststellen. Die CAP-Gehalte stiegen bis drei Stunden nach der Behandlung auf Werte von 2,8 — 3,2 µg/ml und sanken dann kontinuierlich. 18 Stunden nach der Infusion betrugen die Konzentrationen in der Milch aus behandelten Vierteln 0,894 bzw. 0,095 µg/ml, in der Milch aus unbehandelten Vierteln 0,029 — 0,075 µg/ml, während die CAP-Konzentrationen im Serum 0,02 — 0,03 µg/ml betrugen.

Auch NOUWS und ZIV (1982) fanden, daß die Infusion von CAP in ein Euterviertel zur Anwesenheit des Antibiotikums in den nichtbehandelten Vierteln führt. Die CAP-Konzentration in der Milch unbehandelter Viertel betrug annähernd 70% der entsprechenden Plasmaspiegel. Nach Verabreichung von 5 g CAP in ein Euterviertel waren in der Milch der nichtbehandelten Viertel nur Spuren von CAP zu finden. 12,5 g CAP, intramammär verabreicht, bedingten in der Milch unbehandelter Viertel zwei Stunden nach der Behandlung einen durchschnittlichen Maximalwert von 9,3 µg/ml. 24 Stunden nach der intramammären Infusion von 20 — 30 g/Kuh waren die CAP-Konzentrationen in der Milch aus behandelten und unbehandelten Vierteln ziemlich gleich und lagen zwischen 2,0 und 2,6 µg/ml. Nach Instillation von 0,5 — 15 g CAP in ein Euterviertel waren 36 Stunden nach der Behandlung keine Rückstände in der Milch nachweisbar. Bei geringer Milchleistung wurde eine Verzögerung der Ausscheidung beobachtet.

EADS (1954) untersuchte die Ausscheidungsverhältnisse mit der Milch nach Verabreichung von 400 mg CAP in jedes Euter- viertel an vier bzw. acht aufeinanderfolgenden Tagen. Zwölf Stunden nach der letzten Behandlung wurden in Milchproben Konzentrationen von 6-56 µg/ml bzw. 29-65 µg/ml, 24 Stunden danach 0-2,5 µg/ml ermittelt. Die Werte wurden mit einer kolorimetrischen Nachweismethode, die aktives CAP und alle Nitrokomponenten erfaßte, bestimmt. Der parallel durchgeführte mikrobiologische Nachweis ergab zwölf Stunden nach der Behandlung CAP-Konzentrationen in der Milch, die niedriger als 3,5 µg/ml waren. Der Autor schließt daraus, daß in der Milchdrüse wahrscheinlich ein beträchtlicher CAP-Abbau unter Bildung inaktiver Nitrokomponenten stattfindet.

Die Frage, ob intrauterine Gabe von CAP ebenfalls zu einer Ausscheidung durch die Milch führt, wird unterschiedlich beantwortet. Während bei Experimenten von GEDEK et al. (1975 a, 1975 b) die intrauterine Verabreichung verschiedener Antibiotika bei den meisten Präparaten zu Rückständen in der Milch führte, die bis zu sechs Gemelke p.appl. nachgewiesen werden konnten, führte die intrauterine Behandlung von Puerperalkühen und Kühen im Östrus mit 2 g CAP zu keinen meßbaren CAP-Konzentrationen in der Milch. Allerdings lag die Erfassungsgrenze für den mikrobiologischen Nachweis von CAP in der Milch bei 3,1 µg/ml.

Zu abweichenden Ergebnissen kamen BLACK et al. (1979), die nach intrauteriner Infusion von 400 mg CAP Rückstände in der Milch nachweisen konnten. Bei drei von 20 behandelten Kühen konnten in der Milch CAP-Konzentrationen zwischen 2,5 und 11,0 µg/ml ermittelt werden. Bei einer Kuh war CAP noch im 6. Gemelk p.appl. zu finden. Die Nachweisgrenze der mikrobiologischen Nachweismethode lag bei 2,5 µg CAP/ml Milch.

GERULL (1981) konnte nach intrauteriner Gabe von insgesamt 6,75 g CAP in Form von Uterusstäben (3 mal je 3 Uterusstäbe innerhalb von 7 Tagen) an vier Kühe eine lange Ausscheidungs-dauer mit der Milch feststellen. Noch sieben Tage nach der letzten Applikation wurden in der Milch einer Kuh 0,05 µg/ml nachgewiesen. Für die lange Ausscheidungs-dauer des CAP mit der Milch wurde die langsame Resorption der Uterusstäbe verantwortlich gemacht. Bei der Schlachtung hatten alle Kühe Reste der zuletzt eingelegten Stäbe im Uterus vorliegen.

2.3 MIKROBIOLOGISCHER NACHWEIS VON CHLORAMPHENICOL-RÜCKSTÄNDEN IN DER MILCH

Zum Nachweis von Hemmstoffen in der Milch werden überwiegend mikrobiologische Methoden eingesetzt. Diese Verfahren beruhen auf der besonderen Empfindlichkeit einiger Mikroorganismen gegenüber Hemmstoffen. Sie benützen als sichtbares Zeichen das Ausbleiben der Vermehrung von Testkeimen oder den Ausfall spezifischer Stoffwechselleistungen. Neben der eigentlichen Kontrolle des Wachstums werden zur Feststellung der Keimvermehrung auch unterschiedliche Fähigkeiten der verschiedenen Reaktionssysteme wie Säuerungs- und Reduktionsvermögen, Koagulationsfähigkeit und Glucosevergärung angewendet. Diese Tests erlauben zwar keine Differenzierung der einzelnen Hemm-substanzen, zeigen aber in relativ kurzer Zeit das Vorliegen von Hemmstoffen an (TERPLAN und ZAADHOF, 1967).

Bei den Agardiffusionsverfahren in Form des Blättchen-, Loch- oder Zylindertests kommt es durch das Wachstum von Testkeimen zur Ausbildung multipler Mikrokolonien und somit zu einer Trübung des Nährbodens. Bei hemmstoffhaltigen Milchproben bleibt das Wachstum aus, so daß sich um das betreffende Loch bzw. Papierblättchen eine klare Zone bildet. Die Größe der entstandenen Hemm-

höfe läßt Rückschlüsse auf den Hemmstoffgehalt der Milch zu. Als Testkeime kommen z.B. *B.subtilis*, *B.stearothermophilus var.calidolactis* und *Sarcina lutea* in Betracht (TERPLAN et al., 1979).

Als weitere Prinzipien des Hemmstoffnachweises in der Milch kommen S ä u e r u n g s - u n d R e d u k t i o n s - v e r f a h r e n zur Anwendung. Die zu untersuchende Milch wird mit einer Testkultur (Joghurt oder *Sc.thermophilus*) beimpft und bebrütet. Die Säuerung wird mit derjenigen einer hemmstofffreien Kontrollprobe verglichen bzw. es wird die Differenz zwischen der Reduktionszeit der zu untersuchenden Milch und der Kontrollprobe ermittelt (TERPLAN und ZAADHOF, 1967).

Der Laktat-Hemmungstest beruht darauf, daß Antibiotika das Wachstum bzw. die Stoffwechselaktivität von Joghurtkulturen oder anderen Testkeimen hemmen. Antibiotikahaltige Milch hemmt die mikrobiell bedingte Glykolyse und damit die Laktatbildung. Es erfolgt keine Säuerung der Milch durch die Testkeime. Ausgehend von dem Milchsäurebildungsvermögen der Joghurtkulturen als Meßgröße kann diejenige Konzentration an Hemmstoffen in der Milch ermittelt werden, die unter standardisierten Bedingungen zur Hemmung der Glykolyse führt. Das Nachweisprinzip für die Milchsäure beruht auf der enzymatisch katalysierten Oxidation vom Laktat zum Pyruvat (HAMANN 1973).

Der Methylenblau-Reduktionstest, der ebenfalls mit Joghurtkulturen durchgeführt wird, basiert auf der Ermittlung der Differenz zwischen der Reduktionszeit der zu untersuchenden Probe und einer Kontrollprobe. Bei einer hemmstoffhaltigen Milch unterbleibt oder verzögert sich die Reduktion (TERPLAN et al., 1979).

In der routinemäßigen Untersuchung von Milch auf Hemmstoffe hat sich der von KRAACK und TOLLE (1967) entwickelte Brillantschwarz-Reduktionstest (BRT) durchgesetzt. Er ist eine Kombination von Agardiffusions- und Reduktionstest mit *B.stearo-*

thermophilus var. calidolactis als Testkeim und Brillantschwarz als Redoxindikator. Der blauviolett gefärbte Agar zeigt nach Einwirkung von hemmstoffhaltiger Milch keine Veränderung des Farbtons. Nach Einwirkung hemmstofffreier Milch reduzieren die Testkeime Brillantschwarz zur gelben Reaktionsstufe (TERPLAN et al., 1979).

Die mikrobiologischen Nachweisverfahren sind einfach durchzuführen und erfordern geringen personellen und apparativen Aufwand. Sie erlauben jedoch nicht die Identifizierung eines bestimmten Antibiotikums, weil von verschiedenen antimikrobiell wirksamen Substanzen dieselbe Reaktion hervorgerufen werden kann (HAMANN, 1973). Während viele Antibiotika mit mikrobiologischen Tests äußerst empfindlich nachgewiesen werden können, sind die Erfassungsgrenzen dieser Methoden für CAP im Rahmen der Rückstandsanalytik zu hoch.

HAMANN et al. (1980) untersuchten vergleichend die Nachweisempfindlichkeit des Laktat-Hemmungstests und des Brillantschwarz-Reduktionstests für CAP in Milch. Mit der enzymatisch-fluorometrischen Milchsäurebestimmung wurde eine wesentlich höhere Empfindlichkeit mit einer Nachweisgrenze von 0,1 µg/ml erzielt.

GEDEK (1973) ermittelte für den Säurehemmungstest eine Nachweisgrenze von 0,4 µg/ml. Die Erfassungsgrenze von CAP in Milch beim Lochtest mit *Sarcina lutea* betrug 3,1 µg/ml (GEDEK et al., 1975).

2.4 PHYSIKALISCH-CHEMISCHER NACHWEIS VON CHLORAMPHENICOL

2.4.1 Gas chromatographie

a) Grundlagen der Gaschromatographie

Gaschromatographie ist eine Hochleistungschromatographie, mit der jedoch nur Substanzen nachgewiesen werden können, die flüchtig sind oder sich bei hohen Temperaturen verdampfen lassen und von denen man flüchtige Derivate reproduzierbar herstellen kann (MEYER, 1980). Gaschromatographie wurde zur quantitativen Bestimmung von CAP in verschiedenen biologischen Materialien angewendet. Direkte gaschromatographische Bestimmung von CAP ist nicht möglich, weil CAP nicht flüchtig ist. Deshalb ist eine Derivatisierung nötig. Als Detektionssysteme werden normalerweise Flammenionisationsdetektoren (FID) oder Elektroneneinfangdetektoren (ECD) benutzt, wobei letztere wegen ihrer höheren Substanzspezifität zu bevorzugen sind. Auch massenspektrometrische Bestimmung wurde durchgeführt und, obwohl diese Technik für den routinemäßigen Gebrauch nicht anwendbar ist, hat sie besondere Vorteile gegenüber anderen Methoden, weil eine absolute Identifikation des Moleküls gegeben ist. Die gegenwärtige Beliebtheit der Gaschromatographie zur Bestimmung von CAP in biologischem Material beruht auf den niedrigen Erfassungsgrenzen, die Notwendigkeit aufwendiger Reinigungsschritte und Derivatisierung sind jedoch erhebliche Nachteile dieser Analyse (LEE, 1981).

b) Nachweis von Chloramphenicol in der Milch

HAMANN (1973) führte den gaschromatographischen Nachweis von CAP in der Milch mittels Elektroneneinfangdetektor durch. Der Nachweis basierte auf einer mehrfachen Flüssigflüssig-Verteilungstrennung, die erforderliche Flüchtigkeit des CAP wurde durch Derivatisierung zum Trimethylsilylester erreicht. Die quantitative Auswertung des CAP-Peaks erfolgte

durch Vergleich unterschiedlicher CAP-Konzentrationen mit konstantem Dieldrin-Gehalt. Das qualitative Merkmal war die relative Retentionszeit im Verhältnis zum Dieldrin.

HOLLSTEIN et al. (1981) erarbeiteten ein Analysenverfahren zur CAP-Rückstandsbestimmung in verschiedenen tierischen Materialien, u.a. auch in Milch. Die quantitative Bestimmung des CAP wurde gaschromatographisch mit Elektroneneinfangdetektor durchgeführt. Die geringste nachweisbare Menge an CAP betrug 50 pg bei einer Peakhöhe von 5 mm. Als untere Nachweisgrenze in der Milch wurde 0,01 µg/ml ermittelt.

Auch KARLOWSKI (1976) beschrieb eine Methode zur gaschromatographischen Bestimmung von CAP-Rückständen in der Milch. Hier erfolgte ebenfalls eine Derivatisierung des CAP zum Trimethylsilylester bei Verwendung eines Flammenionisationsdetektors. Die Empfindlichkeit der Methode lag bei 0,01 µg/ml.

GERULL (1981) entwickelte eine gaschromatographische Nachweismethode, die es erlaubte, CAP in Lebensmitteln tierischer Herkunft auch im Spurenbereich noch quantitativ zu erfassen. Die Aufarbeitung der Proben beinhaltete keine aufwendigen Reinigungsschritte, die Wiederfindung lag in Milchextrakten jedoch nur bei 75%, in Fleisch- und Organextrakten zwischen 80% und 90%. Durch die Benützung eines internen Standards, der vor der Aufarbeitung zugesetzt wurde, konnten die Aufarbeitungsverluste rechnerisch ausgeglichen werden. Bei einer Probenmenge von 10 g und einer Einspritzmenge von 2 µl konnten noch 0,0025 µg/ml quantitativ erfaßt werden.

HOLTMANNSPOTTER und THIER (1982) bestimmten gaschromatographisch CAP-Rückstände in Eiern, Fleisch und Milch. CAP konnte in der Regel noch in Konzentrationen unter 0,1 mg/kg erfaßt werden. Die Wiederfindungsrate für CAP aus Milch betrug über 90%.

2.4.2 H o c h d r u c k f l ü s s i g k e i t s - c h r o m a t o g r a p h i e

a) Grundlagen

Die Flüssigkeitschromatographie wurde 1906 entdeckt und seit 1931 bei chemischen Analysen häufig angewendet, erreichte aber bis vor zehn Jahren niemals solche Ausmaße wie die Gaschromatographie. Das ist in erster Linie auf technische Unzulänglichkeiten zurückzuführen. Ab 1970 wurden diese Schwierigkeiten durch den technischen Fortschritt auf diesem Gebiet überwunden. Die Entwicklung von Hochdruckpumpen mit Impulsbeschränkung, von Säulen und Injektionssystemen, die dem Hochdruck angepaßt sind und von leistungsstarken Detektionssystemen führte zu einer Renaissance der Säulenflüssigkeitschromatographie und zu einem völlig neuen und leistungsstarken Trennverfahren, der Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC). HPLC ist die Abkürzung für High Pressure Liquid Chromatography. Der größte Vorteil der HPLC gegenüber der Gaschromatographie ist die Brauchbarkeit zur Bestimmung thermolabiler Substanzen und nicht flüchtiger Verbindungen. Beide Faktoren treffen für die meisten Arzneimittel zu. Außerdem macht die hohe Trennkraft der HPLC diese Technik besonders geeignet zur Darstellung eng verwandter Verbindungen und damit zur Erforschung von Metabolisierungsvorgängen. HPLC-Systeme sind heute handelsüblich und zu annehmbaren Preisen zu erstehen, so daß die HPLC die Gaschromatographie im Labor überflügelt hat (LEE, 1981).

Gegenüber der herkömmlichen Säulenchromatographie zeichnet sich HPLC dadurch aus, daß die Trennung von Gemischen unter Druck und sehr schnell und scharf erfolgt. Eine Pumpe drückt das Lösungsmittel aus einem Vorratsgefäß in die Säule. Vor der Säule erfolgt die Injektion der Probe. Die Trennung eines Substanzgemisches in der Säule erfolgt durch unterschiedliche Adsorption der verschiedenen Molekülsorten im Gemisch an der

stationären Phase. Das System basiert auf der Polarität der mobilen Phase gegenüber der Polarität der stationären Phase. Ein System, in dem die stationäre Phase polarer ist als die mobile Phase, nennt man "straight phase system". Hier werden polare Verbindungen stärker gebunden als apolare. Von "reversed phase system" - Chromatographie mit Phasenumkehr - spricht man immer dann, wenn die stationäre Phase weniger polar ist als die mobile Phase. Die am häufigsten verwendete stationäre Phase ist an Silicagel gebundenes Octadecylsilan (ODS). Die mobile Phase ist immer ein Gemisch aus Wasser und einem organischen Lösungsmittel, meist Methanol. Wasser kann die apolaren, hydrophoben Alkylgruppen der stationären Phase nicht benetzen und in keinerlei Wechselbeziehung zu ihnen treten. Es ist daher die schwächste aller mobilen Phasen und eluiert die Proben am langsamsten. Je größer der Wasseranteil des Eluenten ist, desto länger sind die Retentionszeiten. Probesubstanzen werden von der Reversed-phase Oberfläche umso stärker festgehalten, je weniger sie in Wasser löslich sind, d.h. je unpolarer sie sind. Als Maß für die Tendenz eines Stoffes, sich bevorzugt in der einen oder anderen Phase aufzuhalten, dient der Verteilungskoeffizient K . Damit sich ein Stoffgemisch trennt, müssen die verschiedenen Komponenten im chromatographischen System verschiedene Verteilungskoeffizienten haben. Am Ende der Trennsäule befindet sich ein Detektor, der erkennen soll, wann eine Substanzbande aus der Säule eluiert wird. Er muß also eine Änderung der Zusammensetzung der mobilen Phase feststellen, diese in ein elektrisches Signal umwandeln und das Signal dem Schreiber weiterleiten. Der Schreiber zeichnet dieses dann als Abweichung von der Nulllinie in Form von Gaußkurven, die als Signale oder Peaks bezeichnet werden. Ein UV-Detektor erfaßt nur Stoffe, die bei der gewählten Wellenlänge eine gewisse Mindestabsorption von UV-Licht zeigen, er ist also selektiv (MEYER, 1980).

Angesichts der physikalisch-chemischen Eigenschaften von CAP ist die Reversed-phase Chromatographie das geeignetste Nachweissystem (LEE, 1981). Für die Reversed-phase Chromatographie werden vorwiegend Säulenfüllmaterialien auf der Basis von chemisch modifiziertem Kieselgel verwendet. Die Struktur der chromatographisch aktiven Schicht stellen Octadecylgruppen dar, die chemisch über Si-C-Bindungen an Kieselgel gebunden sind. Mit diesen Trägern sind Verteilungen zwischen einer unpolaren stationären Phase und einer polaren mobilen Phase an der lipophilen Trägeroberfläche möglich. Der zugrundeliegende Trennmechanismus ist die Anziehung zwischen den Kohlenwasserstoffen der Probenmoleküle und den Octadecylgruppen des Trägermaterials durch van der Waal'sche Kräfte. Je mehr die Probenmoleküle Kohlenwasserstoffen ähneln, desto stärker werden sie angezogen. Dieser Unterschied in der chemischen Struktur der Moleküle ist es, der zu einer stärkeren oder schwächeren Sorption an der stationären Phase und damit zu einer Trennung führt.

Große Bedeutung für die Trennleistung besitzt die Korngröße des Säulenfüllmaterials. Nur mit kleinen Teilchendurchmessern erzielt man gute Trennleistungen und kurze Analysenzeiten. Während man noch vor wenigen Jahren Packungsmaterialien der Korngröße 30 - 75 μm verwendete, wurden diese inzwischen für analytische Trennungen weitgehend von Packungsmaterialien mit einer Partikelgröße von 3 - 10 μm abgelöst. Die Verwendung von Packungsmaterialien der kleinen Korngröße war nur möglich, weil für deren Verwendung auch die apparativen und instrumentellen Voraussetzungen geschaffen wurden (MACHEREY-NAGEL, 1982).

Das HPLC-Chromatogramm liefert unmittelbar eine qualitative und quantitative Aussage. Die Elutionszeit ist für jeden Stoff eines Gemisches charakteristisch und die Fläche jedes Signals ist der Menge des entsprechenden Stoffes proportional. Die Retentionszeit einer Substanz ist die Zeit von der Injektion der Probe in die Säule bis zum Erscheinen des Signalmaximums im Chromatogramm. Zur Identifikation eines Peaks injiziert man die in Frage kommende Reinsubstanz und vergleicht die Retentionszeit der Reinsubstanz mit der der Probe. Hat ein Vergleichsstoff die gleiche Retentionszeit wie ein Peak im Chromatogramm, so könnten beide Substanzen identisch sein. Zur Absicherung kann man den Vergleichsstoff mit einem Teil der Probe mischen und miteinander injizieren. Der fragliche Peak soll höher werden ohne irgendwelche Schultern oder Verbreiterungen zu zeigen, d.h. keine Andeutung einer Trennung aufweisen. Verändert man beim UV-Detektor die Wellenlänge, so sollen sich die Signale von Probe und Referenz in gleicher Weise verändern, also um den gleichen Anteil größer oder kleiner werden. Zur quantitativen Analyse injiziert man eine Lösung mit genau bekannter Konzentration des zu bestimmenden Stoffes (externer Standard), bestimmt die Fläche unter dem zugehörigen Peak und ermittelt damit die Konzentration des Stoffes in der Probe. Ein Vergleich der Peakhöhen genügt für eine gute Annäherung. Zur qualitativen Absicherung kann man als internen Standard der Probe und der Eichlösung noch eine weitere Komponente zufügen (MEYER, 1980).

b) Bestimmung von Chloramphenicol

Im internationalen Schrifttum finden sich zahlreiche Angaben über die erfolgreiche Anwendung der HPLC zur Bestimmung von CAP in pharmazeutischen Zubereitungen, menschlichen Körperflüssigkeiten und eßbaren tierischen Geweben.

VIGH und INCZEDY (1976) führten mit HPLC die Trennung von CAP und einigen synthetischen Zwischenstufen von CAP durch. LAIK ALI (1978) und LEBELLE et al. (1979) bestimmten zur Qualitätskontrolle von Arzneimitteln aktives CAP und sein Hydrolyseprodukt NAPD (2-amino-1-(paranitrophenyl)1,3-propandiol) in pharmazeutischen Produkten wie Augensalben, Augentropfen, Ohrentropfen, Dragees und Suppositorien.

Die meisten Publikationen behandeln die quantitative Bestimmung von CAP in menschlichen Körperflüssigkeiten, besonders in Blut und Cerebrospinalflüssigkeit, weil CAP oft zur Behandlung von Meningitis bei Kindern eingesetzt wird. Da CAP in der Humanmedizin bei parenteraler Applikation normalerweise als Ester verabreicht wird, bestimmten die meisten Autoren (VELAGAPUDI et al., 1982; ARAVIND et al., 1980; BURKE et al., 1980; OSEEKEY et al., 1980; WAL et al., 1978; KOUP et al., 1978; THIES und FISCHER, 1978; NILSSON-EHLE et al., 1978) aktives CAP, CAP-3-monosuccinat und CAP-1-monosuccinat in Serum, Harn und Cerebrospinalflüssigkeit von Patienten, um Aufschluß über Pharmakokinetik und Bioverfügbarkeit von CAP-Succinat zu erhalten. GAL et al. (1980), CHRECHIOLO und HILL (1979), SAMPLE et al. (1979) und PENG et al. (1978) bestimmten nur aktives CAP in Serum und Cerebrospinalflüssigkeit. Die Bedingungen für die HPLC-Analyse von CAP variierten in den einzelnen Publikationen stark, so daß es nicht möglich ist, alle Verfahren und Ergebnisse im Detail darzulegen. Deshalb sollen nur die wichtigsten Übereinstimmungen und Unterschiede aufgezeigt werden. Bis auf zwei Autoren benützten alle Reversed-phase Trennsäulen (C_{18}), die Wellenlängen des UV-Detektors wurden bei 254 nm (GAL et al., 1980; WAL et al., 1978; LEBELLE et al., 1979; VIGH und INCZEDY, 1976) oder bei 272 nm bis 280 nm gewählt, die Injektionsvolumina reichten von 5 μ l — 50 μ l, die Wiederfindungsraten schwankten von 45% — 116%.

Die Mehrzahl der Untersucher prüften zahlreiche Pharmaka auf Interferenzen mit CAP. Übereinstimmend wurde die ausgezeichnete Selektivität der HPLC bestätigt. Die Bestimmung herkömmlicher Antibiotika wie Gentamycin, Ampicillin, Penicillin, Oxacillin, Erythromycin sowie vieler anderer Arzneimittel mit HPLC ergab, daß alle Komponenten, die im Chromatogramm Peaks erzeugten, nicht mit CAP oder CAP-Succinat interferierten. Lediglich BURKE et al. (1980) berichteten, daß Trimethoprim mit CAP-3-Succinat interferierte. KOUP et al. (1978) stellten fest, daß Gentamycin zur gleichen Zeit wie CAP einen kleinen Peak im Chromatogramm produzierte, Gentamycin wurde aber bei der Probenaufbereitung nicht mitextrahiert und störte somit nicht bei der HPLC-Analyse von CAP.

Nach Ansicht aller Untersucher stellt die HPLC ein zuverlässiges analytisches Verfahren zum Nachweis von CAP dar, das gut brauchbar ist für die Routineanwendung in Klinik und Forschung.

HPLC wurde auch zur Bestimmung von CAP in tierischen Geweben und Körperflüssigkeiten benützt. KUTTER et al. (1982) schlugen zur Überwachung der gesetzlich festgelegten Wartezeit für CAP einen Screening-Test zum Nachweis von CAP in Harn, Niere und Muskel von Schlachttieren mittels HPLC vor. Bei Verwendung von Reversed-phase Trennsäulen (C_{18}) und einer Wellenlänge von 278 nm lag die Nachweisgrenze um 1 ng absolut, so daß bei Verarbeitung von 2 g Probenmaterial CAP-Mengen unter 2 µg/kg gefunden werden konnten. Nach Meinung der Autoren ist HPLC im Hinblick auf rasche Durchführbarkeit und hohe Empfindlichkeit für die routinemäßige Lebensmittelüberwachung gut geeignet.

RÜSSEL (1978) wies mit HPLC unter Verwendung einer Reversed-phase Trennsäule (10- NO_2) bei einer Wellenlänge von 254 nm CAP-Rückstände in Fleisch nach. Im Rahmen dieser Versuche konnte nicht festgestellt werden, ob bei 10 g Probenmenge

und einer Wiederfindungsrate von 71% die angestrebte Bestimmungsgrenze von $0,01 \mu\text{g}/\text{mg}$ erreicht werden kann.

JOHANNES et al. (1983) bestimmten mit einer Reversed-phase Trennsäule (C_{18}) bei einer Wellenlänge von 278 nm CAP-Rückstände in Serum, Niere, Harn, Muskel und Leber von Schlachttieren. Die Wiederfindungsrate betrug je nach Cleanup-Methode 40% — 80%, die Nachweisgrenze war bei 10 g Probenmenge $0,01 \mu\text{g}/\text{ml}$.

c) Bestimmung von Chloramphenicol in Milch

Die HPLC kommt auch zur Überprüfung des Vorhandenseins von CAP-Rückständen in der Milch in Betracht. In der Literatur erschienen bisher nur drei Berichte über die CAP-Bestimmung in Milch mit HPLC.

WAL et al. (1980), LEE (1981) und PETZ (1983) erreichten durch Modifikation bei der Extraktion und Reinigung eine Anwendbarkeit der HPLC zur Analyse von CAP in der Milch. Die entwickelten Verfahren zeichneten sich durch gute Wiederfindungsraten und niedrige Nachweisgrenzen aus.

WAL et al. (1980) extrahierten mit Ethylacetat, wobei nur freies CAP in den Extrakt gelangte. Die Reinigung des Extraktes wurde mit iso-Octan und Chloroform durchgeführt. Durch die Reinigungsprozedur konnten alle störenden Substanzen entfernt werden, im Chromatogramm erschienen keine interferierenden Peaks. Die quantitative Bestimmung erfolgte durch Vergleich der Peakhöhen von Standardlösungen und Probelösung. Die Wiederfindungsrate lag zwischen 68% und 104%, die Erfassungsgrenze war $0,01 \mu\text{g}/\text{ml}$, wenn 25 ml Milch zur Extraktion kamen und der getrocknete Rückstand in 0,2 ml Lösungsmittel gelöst wurde.

LEE (1981) beschäftigte sich nicht nur mit der Rückstandsanalyse von CAP in Milch, sondern stellte auch pharmakokinetische Untersuchungen an, indem er HPLC zur Trennung von CAP und seinen Abbauprodukten benützte. Die Extraktion mit Diethylether und Reinigung mit Petrolether war zufriedenstellend für die Bestimmung von CAP aus Milch, nicht jedoch für Abbauprodukte und Metaboliten aufgrund zu geringer Wiederfindung. Das HPLC-System war nicht anwendbar für die gleichzeitige Bestimmung von CAP und all seiner Abbauprodukte, zeigte jedoch befriedigende Selektivität bei der Bestimmung der entweder mehr hydrophilen oder mehr hydrophoben Komponenten. Bei 5 ml Probenmenge war das Detektionslimit für CAP $0,4 \mu\text{g}$, wenn der Rückstand in $0,1 \text{ ml}$ Eluent gelöst wurde. Die Wiederfindungsrate betrug für CAP $83\% - 85\%$.

PETZ (1983) beschrieb ein einfaches HPLC-Verfahren, mit dem u.a. CAP-Rückstände in Eiern, Fleisch und Milch nachgewiesen werden konnten. Die Extraktion erfolgte mit Acetonitril, der Abdampfrückstand wurde mit n-Hexan ausgeschüttelt. Die Analyse wurde mit Umkehrphasenchromatographie und UV-Detektion bei einer Wellenlänge von 275 nm durchgeführt. CAP-Gehalte von $0,02 \mu\text{g/ml}$ Milch wurden bei Ausbeuten von über 90% sicher erfaßt.

2.4.3 W e i t e r e p h y s i k a l i s c h - c h e m i s c h e N a c h w e i s m e t h o d e n f ü r C h l o r a m p h e n i c o l i n M i l c h

Der Vollständigkeit halber sollen noch einige Nachweismethoden, die keinen besonderen Stellenwert bei der Rückstandsanalyse von CAP aus Milch einnehmen, erwähnt werden.

a) Kolorimetrie

GLAZKO et al. (1949 a) bestimmten erstmals kolorimetrisch CAP in biologischem Material. Der kolorimetrische Nachweis von CAP basierte auf der quantitativen Reduktion der aromatischen Nitrogruppe, gefolgt von Diazotierung und Kopplung des entstehenden Amins mit dem sogenannten Bratton-Marshall-Reagenz. Die Intensität des entstehenden Farbkomplexes wurde photometrisch bestimmt, wobei eine direkte Proportionalität zwischen Extinktion und CAP-Gehalt bestand. Mit kolorimetrischen Methoden kann man gewöhnlich nicht selektiv zwischen CAP und verwandten Verbindungen unterscheiden, weil Abbauprodukte und Metaboliten, die die Nitrogruppe enthalten, bei der Bestimmung mit erfaßt werden. Die Methode kann jedoch durch vorhergehende Extraktion mit organischen Lösungsmitteln spezifisch für aktives CAP gemacht werden.

ALESSANDRO (1963) verwendete dieses Nachweisprinzip zur Bestimmung von CAP nach Extraktion aus Milch unter Verwendung von Dichloramin-T und arseniksaurem Salz.

b) Dünnschichtchromatographie

Bei der Dünnschichtchromatographie wird die unterschiedliche Löslichkeit der zu trennenden Substanzen im Laufmittel ausgenutzt. Als stationäre Phasen werden bevorzugt Cellulose- oder Kieselgelplatten verwendet. Die Sichtbarmachung gewanderter Antibiotika geschieht durch die anschließende Überschichtung und Bebrütung der Platten mit einem Nährboden-Testkeim-Gemisch. Nach beendeter Bebrütung zeigen sich über den Absorptionsstellen der Antibiotika kreisförmige Hemmzonen. Die Sichtbarmachung der Absorptionsstelle kann auch ohne Testkeime und Bebrütung durch einen Fluoreszenzindikator erreicht werden (HAMANN 1973).

HAMANN (1973) führte semiquantitative dünnschichtchromatographische Bestimmungen von CAP aus Milch durch. Der mikrobiologische Nachweis von extrahiertem CAP-Hydrat erfolgte auf Celluloseplatten durch Überschichten mit einer Sporensuspension von *B. subtilis*. Über den Absorptionsstellen von CAP zeigten sich deutlich wahrnehmbare, meist kreisförmig begrenzte Hemmzonen. Die Nachweisgrenze wurde bei Anfärbung mit Phenolrot mit 0,01 mg/kg in der Ausgangsmilch angegeben, wenn 100 ml Milch extrahiert wurden. Der chemisch-physikalische Nachweis eines Extraktes von silyliertem CAP auf Kieselgelplatten erfolgte durch Auslöschen der Fluoreszenz eines Indikators im kurzwelligen UV-Licht. Durch starkes Einengen des Extraktes konnte eine Steigerung der Nachweisempfindlichkeit bis 0,01 mg/kg erzielt werden.

BOSSUYT et al. (1976) benützten die Dünnschichtchromatographie mit Kieselgelplatten und verschiedenen Testorganismen zur Trennung und quantitativen Bestimmung verschiedener Antibiotika aus Milch. Nach mehreren Extraktionsschritten und Einengung des Extrakts wurde für CAP als untere Nachweisgrenze 1 mg/kg angegeben. Die Visualisierung der Absorptionsstelle von CAP erfolgte durch Bioautographie.

TAKESHITA und YAMASHITA (1972) ermittelten bei dünnschichtchromatographischem Nachweis von CAP aus Milch eine Erfassungsgrenze von 0,5 mg/kg.

C) Polarographie

Die Polarographie stellt ein elektrochemisches Verfahren unter Verwendung einer Quecksilberelektrode als Arbeitselektrode dar. In der Detektorzelle wird eine Probesubstanz entweder oxidiert oder reduziert. Die Spezifität des Systems ist durch Änderung des Elektrodenpotentials fast beliebig einstellbar. Die qualitative und quantitative Bestimmung er-

folgt durch Auswertung von Strom-Spannungskurven. Aus der Lage der Kurve bezüglich der Potentialachse kann man auf die Art des zu untersuchenden Stoffes schließen, die Höhe der Kurve ist der Konzentration des Stoffes proportional (MOORE und HUMMEL, 1973).

Als 1949 die Struktur von CAP aufgeklärt wurde und bekannt war, daß aromatische Nitroverbindungen auf einer Quecksilber-elektrode reduziert werden, kam die Polarographie auch zum Nachweis von CAP in Betracht (LEE, 1981). 1950 erschien die erste Veröffentlichung über den polarographischen Nachweis von CAP (HESS, 1950).

FOSSDAL und JACOBSEN (1971) führten eine direkte polarographische Bestimmung - direct current polarography (d.c.p.) - von CAP in der Milch durch. Es war möglich, mit d.c.p. CAP aus einer Mischung von Milch und Phosphatpuffer direkt nachzuweisen, dabei wurden jedoch Milchproteine an der Elektrode absorbiert und produzierten verformte Kurven.

In jüngerer Zeit wurde von BENNEKOM und SCHUTE (1977) die Technik der "klassischen Polarographie" zu einem empfindlicheren und leistungsfähigeren Verfahren modifiziert, zur high performance differential pulse polarography (h.p.d.p.p.).

LEE et al. (1980) bestimmten erstmals CAP mit h.p.d.p.p. Zum Nachweis von CAP in Milch war die Extraktion von CAP aus der Milch nötig, weil der CAP-Peak bei Anwesenheit von Milchbestandteilen fast völlig verschwand. Die Wiederfindungsrate lag bei 60%, die Nachweisgrenze für CAP nach Extraktion aus Milch wurde mit 0,02 µg/ml angegeben. Die Methode eignete sich auch zur Bestimmung von CAP-Abbauprodukten, die die Nitrogruppe enthielten.

3. E I G E N E U N T E R S U C H U N G E N

3.1 MATERIAL

3.1.1 C h l o r a m p h e n i c o l - P r ä p a r a t e

Zur intramuskulären, intrazisternalen und intrauterinen Verabreichung wurden folgende drei CAP-Präparate verwendet:

- A. Chloroject L^R Injektionslösung 2o% (TAD, Cuxhaven)
1 ml Injektionslösung enthält 2oo mg Chloramphenicol (BGA-Reg.-Nr. C 1333, Ch.-B: 2o393s)
- B. Chloromycetin^R Euterinstillation (PARKE-DAVIS, München)
in wäßriger Suspension. Ein Injektor mit 6,66 ml enthält 1ooo mg Chloromycetin (BGA-Reg.-Nr. C 13o2, CH.-B: oo12o4o)
- C. Entamydol^R Schaumspray (BOEHRINGER, Ingelheim)
1o g ölige Suspension enthalten 1ooo mg Chloramphenicol und 5oo mg Neomycin-Sulfat (BGA-Reg.-Nr. 89915, Ch.-B: 52o7o2)

3.1.2 T e s t s u b s t a n z e n

Als Referenzsubstanz zur qualitativen und quantitativen Bestimmung von CAP wurde Chloramphenicol pharm. (SERVA FEIN-BIOCHEMICA, Heidelberg) verwendet.

Als weitere Testsubstanzen standen zur Verfügung:

- A. Thiamphenicol (SIGMA CHEMICAL COMPANY, München)
- B. Streptomycin-Sulfat (BAYER, Leverkusen)
- C. Tetracyclin-Base (BAYER, Leverkusen)
- D. Penicillin-G-Kalium (BAYER, Leverkusen)
- E. Trimethoprim-Laktat (BORROUGHS WELLCOME & CO, London)
- F. Sulfadimidin (IMPfstoffwerke Friesoythe GmbH, Friesoythe)
- G. Chloramin-T (SERVA FEINBIOCHEMICA, Heidelberg)
- H. β -Glucuronidase Nr. G-351o Type Ix (SIGMA CHEMICAL COMPANY, München)

3.1.3 M i l c h p r o b e n

Zur Untersuchung der Ausscheidung von CAP mit der Milch wurden acht Milchkühe aus dem Milchviehbestand der Staatlichen Versuchsgüterverwaltung Grub bei München herangezogen. Alle Versuchstiere gehörten der Rasse Deutsches Fleckvieh an. Die Kühe waren klinisch gesund und mindestens vier Wochen vor Versuchsbeginn nicht mehr antibiotisch behandelt worden. Die täglichen Milchleistungen betrugen 13 — 22 kg. Das Alter der Kühe lag zwischen fünf und zehn Jahren. Insgesamt wurden 200 Viertelanfangsgemelkproben genommen. Zu weiteren Untersuchungen standen neun Tankmilchproben der Milchunion Oberbayern zur Verfügung.

3.2 METHODIK

3.2.1 I s o l i e r u n g v o n C h l o r a m p h e n i - c o l a u s d e r M i l c h

Bei der Erarbeitung des Analysenverfahrens wurde auf die Methode von WAL et al. (1980) zurückgegriffen. Die Technik zur Aufbereitung von Milch für die HPLC-Analyse wurde wie folgt modifiziert:

Reagenzien

- A. Ethylacetat zur Analyse (MERCK, Darmstadt)
- B. Acetonitril zur Synthese (MERCK, Darmstadt)
- C. iso-Octan zur Analyse (MERCK, Darmstadt)
- D. Methanol zur Analyse (MERCK, Darmstadt)

Extraktions- und Reinigungsverfahren

Die grobe Entfettung der Milch erfolgt durch Zentrifugieren (10 min bei 3000 U/min). 25 ml der entfetteten Milch und 80 ml

Ethylacetat werden ca. 2 min lang in einem 250 ml-Scheidetrichter geschüttelt. Nach der Phasentrennung werden mit Stabpipette und Saughilfe 40 ml der Ethylacetatphase in einen 50 ml-Rundkolben verbracht und im Vakuum-Rotationsverdampfer schonend zur Trockne eingengt. Der Rückstand wird mit 1 x 3 ml, 1 x 2 ml und 1 x 1 ml Acetonitril in ein graduiertes 15 ml-Reagenzglas übergeführt. Das Acetonitril wird mit 3 ml iso-Octan im Reagenzglasschüttler ausgeschüttelt. Nach kurzem Zentrifugieren wird die obere iso-Octanphase mit Pasteurkapillarpipetten abgehoben und verworfen. Dieser Vorgang ist 3-5 mal zu wiederholen, bis der Extrakt frei von Verunreinigungen ist. Die gereinigte Acetonitrilphase wird in einem 20 ml-Spitzkolben schonend bei maximal 30°C zur Trockne eingengt. Der Rückstand im Spitzkolben ist bei geringen CAP-Konzentrationen in 0,2 ml Methanol zu lösen. Sind höhere Konzentrationen zu erwarten, wird der Rückstand in entsprechend größerem Volumen Methanol gelöst.

3.2.2 Q u a l i t a t i v e u n d q u a n t i t a t i v e B e s t i m m u n g v o n C h l o r - a m p h e n i c o l

HPLC-Apparatur

Es wurde folgende HPLC-Apparatur verwendet:

- A. 2 Kurzhubdoppelkolbenpumpen, Constametric II G (LATEK, Heidelberg)
- B. Vorsäule: Füllung Perisorb^R RP 18, 60 x 8 x 4 mm, Korngröße 30 - 40 µm (MERCK, Darmstadt)
- C. Trennsäule: Füllung Nucleosil^R RP C₁₈ reversed phase 250 x 8 x 4 mm, Korngröße 5 µm (MACHEREY-NAGEL, Düren)
- D. UV-Detektor mit variabler Wellenlänge (200 - 700 nm) Spectro Monitor II, Modell 1202 (LATEK, Heidelberg)
- E. Einkanalschreiber, Recorder W+W 1107 (W+W ELECTRONIC AG, Basel)
- F. Mikroliterspritzen zur Probenaufgabe 10 - 100 µl (HAMILTON CO., Reno Nevada)

HPLC-Bedingungen

Elutionsmittel: Wasser/Methanol (60/40)
Durchflußrate: 0,9 ml/min
Wellenlänge: 254 nm
Empfindlichkeit: 0,02 AUFS
Recorder: 10 mV, Geschwindigkeit 10 cm/h
Injektionsvolumen: 10 µl

Herstellung von Eichlösungen

Die Eichlösungen, die als Referenz und zur Quantifizierung von CAP-Rückständen dienten, wurden folgendermaßen hergestellt:

Lösung I: 250 mg Reinsubstanz in 50 ml Methanol gelöst
(1 ml = 5 mg CAP)
Lösung II: 5 ml Lösung I auf 50 ml Methanol aufgefüllt
(1 ml = 0,5 mg CAP)
Lösung III: 2 ml Lösung II auf 10 ml Methanol aufgefüllt
(1 ml = 0,1 mg CAP)
Lösung IV: 2 ml Lösung III auf 20 ml Methanol aufgefüllt
(1 ml = 0,01 mg CAP)
Lösung V: 2 ml Lösung IV auf 10 ml Methanol aufgefüllt
(1 ml = 0,002 mg CAP)

3.2.3 Verabreichung von Chlor- amphenicol an Versuchskühe und Gewinnung der Milchproben

Die Behandlung der Versuchskühe erfolgte mit handelsüblichen CAP-Präparaten in der vom Hersteller angegebenen Höchstdosierung. Zwei Kühen wurden jeweils 25 ml Chloroject^R (5 g CAP) intramuskulär verabreicht. Die ersten Milchproben wurden etwa zwölf Stunden, die folgenden 18, 24, 36, 42, 48 und 60 Stunden nach der Injektion gewonnen. Drei Kühe wurden intrazisternal behandelt, zwei davon mit je einem Injektor Chloromycetin^R (1 g CAP) in zwei diagonal gelegene Euterviertel

(VR und HL). Eine Kuh erhielt je ein Schaumspray Entamydol^R (1 g CAP) in die gleichen Viertel. Die Probennahme erfolgte hier erstmals vier Stunden nach der Infusion, die weiteren 6, 8, 10, 12, 24 und 36 Stunden danach. Die intra-uterine Behandlung von drei Kühen erfolgte mit je einem Schaumspray Entamydol^R. Die Milchproben wurden acht und 22 Stunden nach der Infusion gewonnen.

Von sämtlichen Versuchstieren wurden vor der Behandlung Milchproben genommen, die zur Bestimmung von Kontroll- und Blindwerten dienten. Die Entnahme aller Milchproben erfolgte immer in der gleichen Weise. Nach Verwerfen des ersten Milchstrahls wurden von jedem Euterviertel etwa 100 ml Anfangsgemelk entnommen. Die Proben wurden in sterile Gefäße gemolken und, sofern sie nicht sofort zur Analyse kamen, bei unter -20°C tiefgefroren.

3.3 VERSUCHE UND VERSUCHSERGEBNISSE

3.3.1 Extraktionsverfahren bei künstlich kontaminierter Milch

In umfangreichen Vorversuchen konnte das von WAL et al. (1980) vorgeschlagene Extraktionsverfahren für CAP aus Milch vereinfacht werden. Die Vorteile der modifizierten Methode bestehen in geringerem Materialverbrauch und Arbeitsaufwand, sowie einer guten Wiederfindung, die bei den Versuchen mit dem Originalverfahren von WAL et al. (1980) nicht erzielt werden konnte.

Zunächst wurde bei der Extraktion von CAP aus künstlich kontaminierter Milch nach der Vorschrift von WAL et al. (1980) verfahren. Es stellte sich heraus, daß im Gegensatz zu den

angegebenen Wiederfindungsraten von 68% — 104% die Wiederfindungsraten bei den eigenen Untersuchungen nur zwischen 45% und 60% rangierten. Durch das Ausschütteln der Milch mit Ethylacetat wurde CAP aus der biologischen Matrix gelöst. Um mitextrahierte Fettspeuren zu entfernen, war eine Reinigung des Extrakts erforderlich. Der getrocknete Rückstand wurde in 5 ml Acetonitril gelöst, in einen 30 ml-Scheidetrichter verbracht und mit iso-Octan ausgeschüttelt. Die Lipide gingen in die iso-Octanphase über, während CAP sich in der Acetonitrilphase befand. In dem Scheidetrichter traten wahrscheinlich große Verluste auf. Teile des gelösten Rückstands blieben an der Gefäßwand hängen, die Phasentrennung war nicht sauber, so daß, wenn man einen fettfreien Extrakt erhalten wollte, Rückstände im Bereich der Phasentrennung verblieben. Deshalb wurde bei diesem Reinigungsschritt eine Modifizierung vorgenommen. Der in 6 ml Acetonitril gelöste Rückstand wurde nicht in einen großvolumigen Scheidetrichter, sondern in ein 15 ml-Reagenzglas übergeführt. Die Ausschüttlung mit 3 ml iso-Octan mit einem Reagenzglasschüttler war intensiver und schneller als die manuelle Ausschüttlung im Scheidetrichter. Die anschließende Zentrifugation brachte eine bessere Phasentrennung. Durch das Abheben der oberen iso-Octanphase mit Pasteurkapillarpipetten konnten Verluste praktisch völlig vermieden werden. Nach mehrmaliger Wiederholung dieser Reinigungsprozedur wurde ein nahezu fettfreier Extrakt erhalten, der weitere Reinigungsschritte unnötig machte. Rückstände an der Gefäßwand wurden mit 1 ml Acetonitril nachgespült und zu dem Extrakt in den Spitzkolben übergeführt.

Bei dem Verfahren von WAL et al. (1980) waren noch weitere Reinigungsschritte nötig, wobei durch das Überführen des Extrakts in ein weiteres Gefäß wieder Verluste in der Wiederfindung auftraten. Auch der Zeitaufwand für die Probenaufbereitung war damit höher.

In dem Extrakt, der nach der modifizierten Methode erhalten wurde, waren alle Substanzen, die im Chromatogramm interferie-

rende Peaks erzeugen könnten, eliminiert. Durch Eindampfen des gereinigten Extrakts und Auflösung des Rückstands in 0,2 ml Methanol wurde eine starke Konzentrierung des CAP erreicht, was den Nachweis sehr geringer CAP-Rückstände ermöglichte. Das entwickelte Verfahren erlaubte die Bestimmung von 0,01 µg/ml CAP in der Milch, wenn 25 ml Milch zur Extraktion gelangten. Der Zeitaufwand für die Analyse einer Probe war etwa eine Stunde, für acht Proben etwa drei Stunden. Während WAL et al. (1980) den Zeitaufwand für eine Probe mit einer Stunde und für sechs Proben mit etwa drei Stunden angaben, wurden bei eigenen Versuchen mit dem Originalverfahren etwa fünf Stunden für acht Proben benötigt.

3.3.2 H P L C - B e d i n g u n g e n u n d S ä u l e n p a r a m e t e r

Es wurden Versuche unternommen, um durch gezielte Wahl der Säulenparameter und durch Schaffung günstiger HPLC-Bedingungen das System für den CAP-Nachweis zu optimieren.

Säulenparameter

Die Säulenparameter sind bestimmend für Trennleistung, Nachweisgrenze, Lösungsmittelverbrauch und Analysenzeit. Zur CAP-Analyse wurde eine handelsübliche Fertigsäule benutzt, die mit Nucleosil^R RP C₁₈ gefüllt war. Bei Nucleosil^R RP C₁₈ handelt es sich um ~~sphärisches~~, kugelförmiges Packungsmaterial auf der Basis von Kieselgel, durch-und-durch porös mit Porenweiten von 100 Å. Die hier verwendete mittlere Teilchengröße von 5 µm erbrachte gute Trennleistungen und kurze Analysenzeiten.

Der Innendurchmesser der Trennsäule von 4 mm und die Säulenlänge von 250 mm wurden so gewählt, weil damit ein optimales Verhältnis zwischen Trennleistung, Elutionsmittelverbrauch und Analysenzeit gegeben war. Kürzere Säulen sind nur für einfache Trennprobleme brauchbar, längere Säulen besitzen zwar eine höhere Kapazität, verbrauchen aber mehr Lösungsmittel und erfordern eine längere Analysenzeit.

Die Lebensdauer der Trennsäule beträgt nach Angaben des Herstellers bei flüssig-flüssig extrahiertem Probematerial etwa 1000 bis 1500 Proben. Zum Schutz der wertvollen Trennsäule vor Verunreinigungen und damit zur Verlängerung der Lebensdauer wurde eine Vorsäule vorgeschaltet. Die Vorsäule konnte ohne besondere Geräte problemlos trocken gefüllt werden.

Das Packungsmaterial war Perisorb^R RP C₁₈, wie in der Trennsäule chemisch an Kieselgel gebundene Kohlenwasserstoffverbindungen, die Korngröße betrug jedoch 30-40 µm. Perisorb^R RP C₁₈ erwies sich als optimales Füllmaterial für Vorsäulen. Es erzeugte im Chromatogramm keine Bandenverbreiterung durch Antrennung von Komponenten eines Gemisches und erlaubte eine rasche Diffusion der Probe.

HPLC-Bedingungen

Durch Variation der HPLC-Bedingungen wurde eine für den CAP-Nachweis günstige Einstellung des Systems ermittelt. Die Verwendung eines UV-Detektors mit variabler Wellenlänge erlaubte eine optimale Nachweisempfindlichkeit durch gezielte Messung im Absorptionsmaximum. CAP zeigte bei einer Wellenlänge von 254 nm eine maximale Absorption von UV-Licht.

In der Literatur ist die Detektion von CAP meist bei 280 nm angegeben, nur wenige Autoren arbeiteten mit 254 nm.

Vergleichende Untersuchungen bei Wellenlängen von 254 nm und 280 nm ergaben, daß die Signalhöhen im Chromatogramm bei 280 nm nur etwa 35% der Signalhöhen bei 254 nm betrug (Abb. 2).

Im Gegensatz hierzu ermittelten KOUP et al. (1978) eine Abnahme der Peakhöhe im Chromatogramm um 44% bei der Wellenlänge von 254 nm gegenüber 270 nm.

Mit der Zusammensetzung der mobilen Phase, 40% Methanol und 60% Wasser, wurde eine gute Trennung und eine vertretbare Analysenzeit erreicht. Mit steigendem Methanolanteil nahm die Kapazität und Selektivität des Systems ab, ebenso die Retentionszeit und damit die Analysendauer. Bei der Mischung des Lösungsmittels war immer zu beachten, daß Luft in der Flüssigkeit gelöst sein kann. Weil Luftblasen aus dem Eluenten eine Instabilität des Systems verursachen, wurde das Methanol-Wasser-Gemisch immer mit Ultraschall entgast. Der Probenextrakt wurde in einem Lösungsmittel (Methanol) gelöst, das auch im Eluenten anwesend war, um zu verhindern, daß Probenmoleküle irreversibel vom Trägermaterial adsorbiert werden bzw. in der Säule ausfallen.

Je höher die Flußrate des Elutionsmittels gewählt wurde, desto kürzer war die Analysenzeit. Die Erhöhung war jedoch nur so weit möglich, wie es der Verlust an Auflösung erlaubte. Die gewählten Durchflußraten von 0,8 - 1,0 ml/min ergaben eine gute Auflösung.

Bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 0,8 ml/min betrug die Retentionszeit für CAP 10,8 min.

Die Empfindlichkeit des UV-Detektors wurde bei 0,02 AUFS (absorption unit full scale) gewählt, weil bei einer höheren Empfindlichkeit die Grundlinienschwankung im Chromatogramm zu groß war.

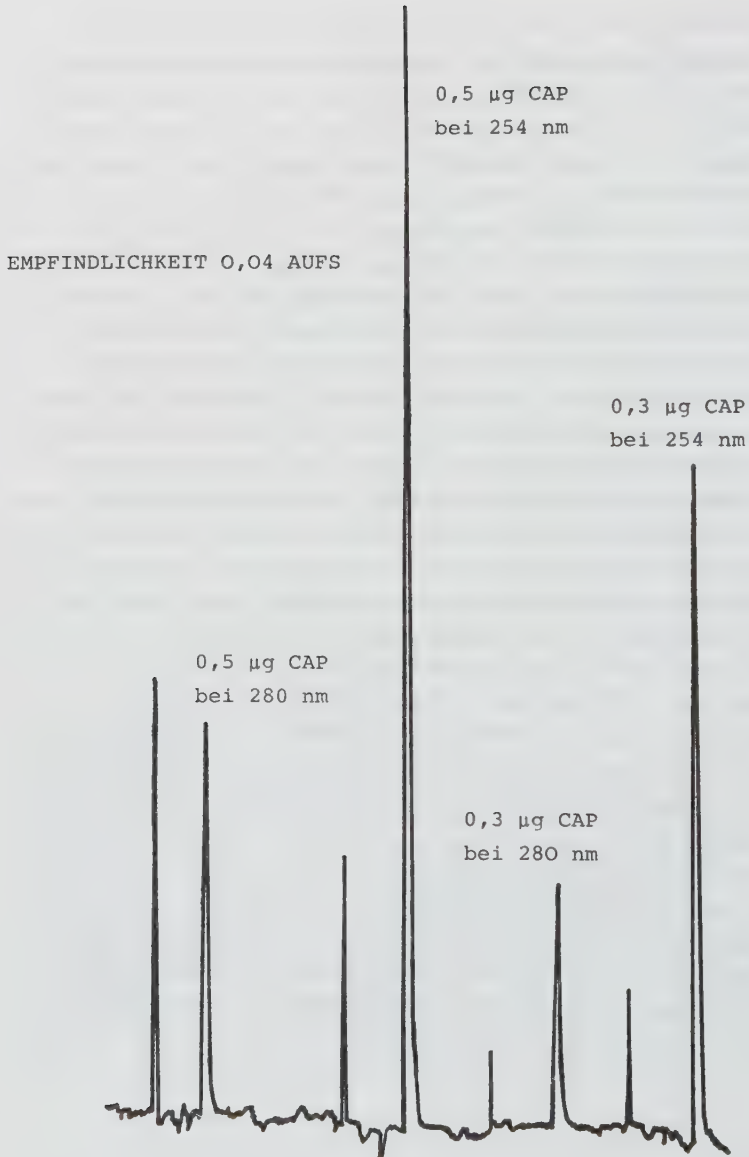


Abb. 2: Chromatogramm von CAP-Eichlösungen bei Wellenlängen von 280 nm und 254 nm

Durchflußrate: 1 ml/min; Retentionszeit: 7,2 min

Nachstehende Aufstellung gibt vergleichend die HPLC-Bedingungen der Originalmethode von WAL et al. (1980) und die der eigenen Untersuchungen wieder.

	WAL et al. (1980)	eigene Versuche
stationäre Phase	Spherisorb ^R RP C ₁₈ Korngröße 5 µm	Nucleosil ^R RP C ₁₈ Korngröße 5 µm
mobile Phase	Methanol/Wasser (30/70)	Methanol/Wasser (40/60)
Trennsäule	250 x 2,1 mm	250 x 8 x 4 mm
UV-Detektor	280 nm	254 nm
Empfindlichkeit	0,01 AUFS	0,02 AUFS
Flußgeschwindigkeit	0,8 ml/min	0,9 ml/min
Injektionsvolumen	10 µl	10 µl

3.3.3 Q u a l i t a t i v e u n d q u a n t i t a t i v e A u s w e r t u n g d e s C h r o m a t o g r a m m s

Die Identifizierung des CAP-Peaks im Chromatogramm erfolgte durch Vergleich der Retentionszeit von CAP-Eichlösungen und Probelösungen. In Zweifelsfällen, die manchmal in Konzentrationsbereichen des Erfassungslimits auftraten, wurde der Probelösung geringe Mengen CAP aus der Eichlösung zugesetzt. Wenn der fragliche Peak wieder als einfacher Peak ohne Schultern oder Verbreiterungen, jedoch höher im Chromatogramm erschien, war bewiesen, daß das Signal vom CAP herührte und nicht etwa von Verunreinigungen im Extrakt. Die Abb. 3 und 4 zeigen Chromatogramme mit Signalen von Proben mit und ohne zugesetztem CAP.

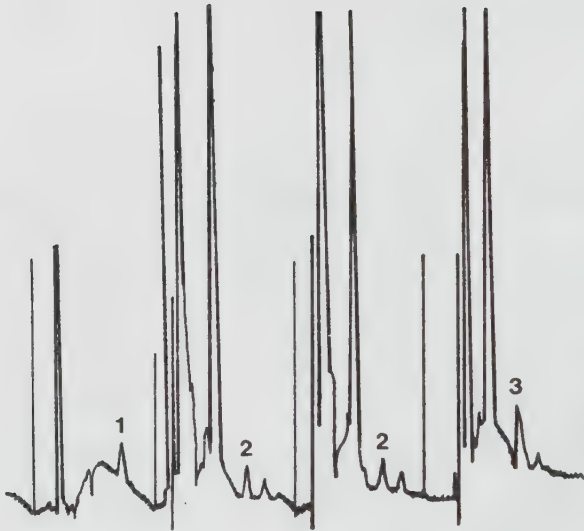


Abb. 3: Chromatogramm von CAP aus Milchproben einer Kuh
(42 Std. p. appl.; i.m.-Verabreichung von 5 g CAP)

Zeichenerklärung:

- 1 = Eichlösung: 5 μ l = 0,01 μ g CAP
- 2 = Probenextrakt, Injektion 10 μ l = 0,01 μ g/ml
- 3 = Probenextrakt mit Spuren von CAP versetzt,
Injektion 10 μ l

HPLC-Bedingungen

Wellenlänge: 254 nm

Empfindlichkeit: 0,02 AUFS

Elutionsmittel: Wasser/Methanol (60/40)

Durchflußrate: 0,85 ml/min

Retentionszeit: 10,2 min

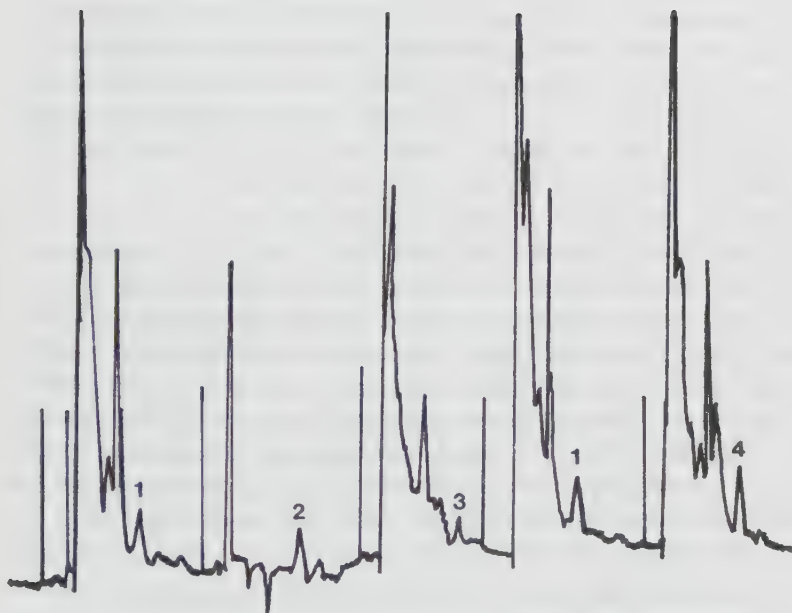


Abb. 4: Chromatogramm von CAP aus Milchproben von zwei Kühen
(36 Std. p. appl.; i.m.-Verabreichung von 5 g CAP pro
Kuh)

Zeichenerklärung:

1 = Probenextrakt Nr. II, Injektion 20 μ l

2 = Eichlösung: 10 μ l = 0,02 μ g CAP

3 = Probenextrakt Nr. I, Injektion 20 μ l

4 = Probenextrakt Nr. II, mit Spuren von CAP versetzt;
Injektion 20 μ l

HPLC-Bedingungen

Wellenlänge: 254 nm

Empfindlichkeit: 0,04 AUFS

Elutionsmittel: Wasser/Methanol (60/40)

Durchflußrate: 0,8 ml/min

Retentionszeit: 10,8 min

Zur quantitativen Bestimmung des CAP-Gehalts in einer Probe wurde nach Injektion der Probe eine Eichlösung mit bekannter CAP-Konzentration injiziert, die Signalhöhe im Chromatogramm gemessen und damit die CAP-Konzentration in der Probe ermittelt. Durch den Peakhöhenvergleich ermittelte man zunächst die Konzentration, die in 10 µl Probe, die zur Injektion kamen, enthalten war. Da der gesamte Rückstand in 0,2 ml Methanol gelöst wurde, ist in 0,2 ml eine 20fache Menge der injizierten Menge, also ist die Konzentration in 10 µl Probe mit 20 zu multiplizieren. Der Rückstand, der in 0,2 ml Methanol gelöst wurde, stammt aus 40 ml Ethylacetat, halb so viel, wie der Milchprobe zugesetzt wurde. Da sich CAP in den gesamten 80 ml Ethylacetat löst, entspricht die Menge CAP, die in 40 ml gelöst ist, der Hälfte des CAP, das in 25 ml Milch enthalten war. Deshalb ist die Konzentration, die in 0,2 ml Methanol gelöst ist mit 2 zu multiplizieren, dieser Wert entspricht dann der Gesamtkonzentration in 25 ml Milch. Um die Konzentration von CAP in 1 ml Milch zu ermitteln, muß durch 25 dividiert werden.

Diese Zusammenhänge können in einem einfachen Rechenbeispiel dargestellt werden:

$$\mu\text{g CAP/ml Milch} = \frac{\text{CAP-Konz. in } 10 \mu\text{l} \times 20 \times 80}{40 \times 25}$$

Wenn z.B. 50 ml Ethylacetat aus 80 ml verwendet werden und der Rückstand in 5 ml Methanol gelöst wird, ergibt sich folgende Rechnung:

$$\mu\text{g CAP/ml Milch} = \frac{\text{CAP-Konz. in } 10 \mu\text{l} \times 500 \times 80}{50 \times 25}$$

Als Nachweisgrenze wurden 0,01 µg/ml ermittelt. Bei Einengung von 50 ml Ethylacetat, Auflösung des Rückstands in 0,2 ml Methanol und Injektion von 10 µl Probe erhält man im Chroma-

togramm bei einer Wellenlänge von 254 nm und der Empfindlichkeit von 0,02 AUFS einen Peak von 0,6 cm Höhe, welcher einer Konzentration von etwa 0,008 µg CAP entspricht. Umgerechnet entspricht dies einer Konzentration von 0,01 µg CAP/ml Milch (Abb. 3).

3.3.4 W i e d e r f i n d u n g s r a t e n

Die Wiederfindungsversuche wurden mit Tankmilch, die mit Eichlösungen in verschiedenen Konzentrationen beschickt wurde, durchgeführt. Die Eichlösungen wurden direkt zu den Milchproben in den Scheidetrichter gegeben, danach wurde weiter nach der Analysenvorschrift verfahren. Eine CAP-Konzentration von 0,1 µg/ml in den Milchproben wurde durch Zugabe von 25 µl Eichlösung III (2,5 µg CAP/25 ml Milch) erreicht, 0,05 µg/ml durch Zugabe von 125 µl Eichlösung IV (1,25 µg CAP/25 ml Milch) und 0,02 µg/ml durch Zugabe von 50 µl Eichlösung IV (0,5 µg CAP/25 ml Milch). Der Quotient aus nachgewiesener und zugefügter Menge CAP stellt die Wiederfindungsrate dar. Sie war bei 0,05 µg/ml mit durchschnittlich 96 % am höchsten und bei 0,02 µg/ml mit durchschnittlich 92 % am niedrigsten. Die einzelnen Ergebnisse sind in Tab. 1 dargestellt. Abb. 5 zeigt das Chromatogramm von CAP aus Milch, die künstlich mit CAP versetzt wurde, um die Wiederfindungsrate zu ermitteln.

Tabelle 1

Wiederfindungsraten von Chloramphenicol

zugegebenes CAP ($\mu\text{g/ml}$ Milch)	nachgewiesenes CAP ($\mu\text{g/ml}$ Milch)	Wiederfindungsrate (%)
0,10	0,096	96
	0,093	93
	0,093	93
	0,089	89
	0,101	101
	0,094	94
	$\bar{x}$ 0,094	$\bar{x}$ 94
		VK 4,26
0,05	0,048	96
	0,045	90
	0,048	96
	0,048	96
	0,049	98
	0,051	102
	$\bar{x}$ 0,048	$\bar{x}$ 96
		VK 4,06
0,02	0,018	90
	0,017	85
	0,018	90
	0,020	100
	0,018	90
	0,019	95
	$\bar{x}$ 0,018	$\bar{x}$ 92
		VK 5,63

$\bar{x}$ = Mittelwert

VK = Variationskoeffizient

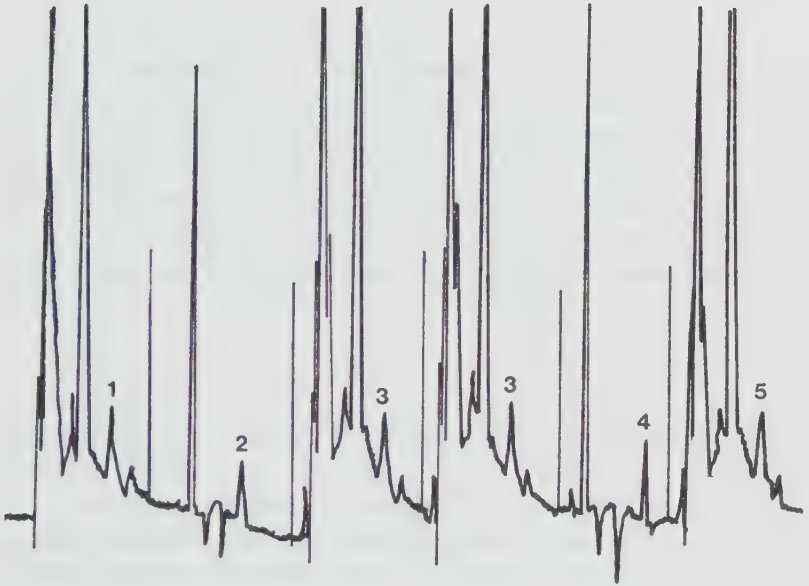


Abb. 5: Chromatogramm von CAP aus künstlich kontaminierten Milchproben (0,02 μg CAP/ml Milch)

Zeichenerklärung:

- 1 = Probenextrakt I, Injektion 10 μl = 0,020 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 2 = Eichlösung: 8 μl = 0,016 μg CAP
- 3 = Probenextrakt II, Injektion 10 μl = 0,019 $\mu\text{g}/\text{ml}$
- 4 = Eichlösung: 10 μl = 0,02 μg CAP
- 5 = Probenextrakt III, Injektion 10 μl = 0,019 $\mu\text{g}/\text{ml}$

HPLC-Bedingungen

Wellenlänge: 254 nm

Empfindlichkeit: 0,02 AUFS

Elutionsmittel: Wasser/Methanol

Durchflußrate: 0,85 ml/min

Retentionszeit: 10,2 min

3.3.5 Reagenzienblindwerte

Um Hinweise für die Durchführbarkeit des Verfahrens zu erhalten, wurden neun Tankmilchproben von der Milchunion Oberbayern auf Substanzen geprüft, die bei der HPLC-Bestimmung mit CAP interferieren könnten. Die Probenaufbereitung entsprach der Analysenvorschrift. Bei der Auswertung der Chromatogramme konnten in keinem Fall störende Peaks im Bereich der Retentionszeit von CAP festgestellt werden.

3.3.6 Interferenzen mit anderen Antibiotika

Zur Prüfung der Frage, ob andere Antibiotika unter den beschriebenen Bedingungen für HPLC mit CAP interferieren, wurden sechs Antibiotika und ein Desinfektionsmittel, die CAP strukturell ähnlich sind, in Reinform der HPLC-Analyse unterzogen. Die Injektion von je 0,5 µg Thiamphenicol, Streptomycin-Sulfat, Tetracyclin-Base, Penicillin-G-Kalium, Trimethoprim-Laktat und Chloramin T führte bei Wellenlängen von 254 nm und 280 nm zu keinerlei Signalen im Chromatogramm. 0,5 µg Sulfadimidin erzeugten im Chromatogramm bei 254 nm und 280 nm ein Signal, das zu einem früheren Zeitpunkt als der CAP-Peak erschien und somit mit CAP nicht interferierte.

3.3.7 Einfluß von β -Glucuronidase auf den Chloramphenicol-Nachweis

Um die Frage zu klären, ob auch an Glucuronsäure gekoppeltes CAP in die Milch sezerniert wird, wurden Milchproben, die

zwölf Stunden nach intramuskulärer Behandlung von zwei Kühen mit 25 ml Chloroject L^R gewonnen wurde, mit β -Glucuronidase inkubiert. Je zwei Milchproben von zwei Kühen wurden 90 Minuten lang bei 37°C mit 1000 IE und 2000 IE β -Glucuronidase inkubiert und anschließend dem beschriebenen Analysenverfahren unterzogen. Die CAP-Konzentrationen in der Milch, die mit dem Enzym bebrütet wurde, entsprachen den Konzentrationen in Vergleichsproben, die nicht mit Glucuronidase in Berührung kamen. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tab. 2 zusammengestellt.

Tabelle 2

CAP-Konzentrationen in Milchproben ohne und mit Zusatz von β -Glucuronidase

Milchprobe von Kuh-Nr. (12 Std. p.appl.*)	Gehalt an β -Glucuronidase (IE)	CAP-Gehalt (μ g/ml Milch)
I	0	0,54
	1000	0,52
	2000	0,54
II	0	0,31
	1000	0,31
	2000	0,31

* i.m.-Injektion von Chloroject L^R (TAD, Cuxhaven)

Dosis: 5 g Chloramphenicol pro Tier

3.3.8 Ausscheidung von Chloramphenicol mit der Milch nach intramuskulärer Applikation

Um die Anwendung des entwickelten Extraktions- und Nachweisverfahrens nicht nur auf künstlich kontaminierte Milch zu beschränken, wurden Ausscheidungsversuche mit Milchkühen durchgeführt.

Für die Bestimmung der CAP-Ausscheidung nach intramuskulärer Injektion wurden zwei Kühe herangezogen. Zur Extraktion gelangte eine Mischung der jeweiligen vier Viertelgemelke. Jede der gemischten Milchproben wurde zweifach analysiert, die ermittelten Werte zeigten eine sehr gute Übereinstimmung. Zur Erstellung der Tab. 3 und der Abb. 6 wurden immer die höheren Werte verwendet. Zwölf Stunden nach der Behandlung konnten in der Milch die höchsten CAP-Konzentrationen von 0,54 µg/ml bzw. 0,31 µg/ml ermittelt werden, 36 und 42 Stunden p.appl. lagen die Werte etwas über der Nachweisgrenze von 0,01 µg/ml, nach 48 Stunden war CAP nicht mehr nachweisbar.

Tabelle 3

Ausscheidung von Chloramphenicol mit der Milch nach intramuskulärer Applikation

Stunden p.appl.*	CAP-Gehalte (µg/ml Milch)	
	Kuh Nr. I	Kuh Nr. II
Ko	n.n.	n.n.
12	0,54	0,31
18	0,22	0,16
24	0,07	0,12
36	0,013	0,018
42	n.u.	0,01
48	n.n.	n.n.
60	n.n.	n.n.

* Chloroject L^R (TAD, Cuxhaven; Dosis: 5 g CAP/Tier
n.n. = nicht nachweisbar; n.u. = nicht untersucht; Ko = Kontrolle

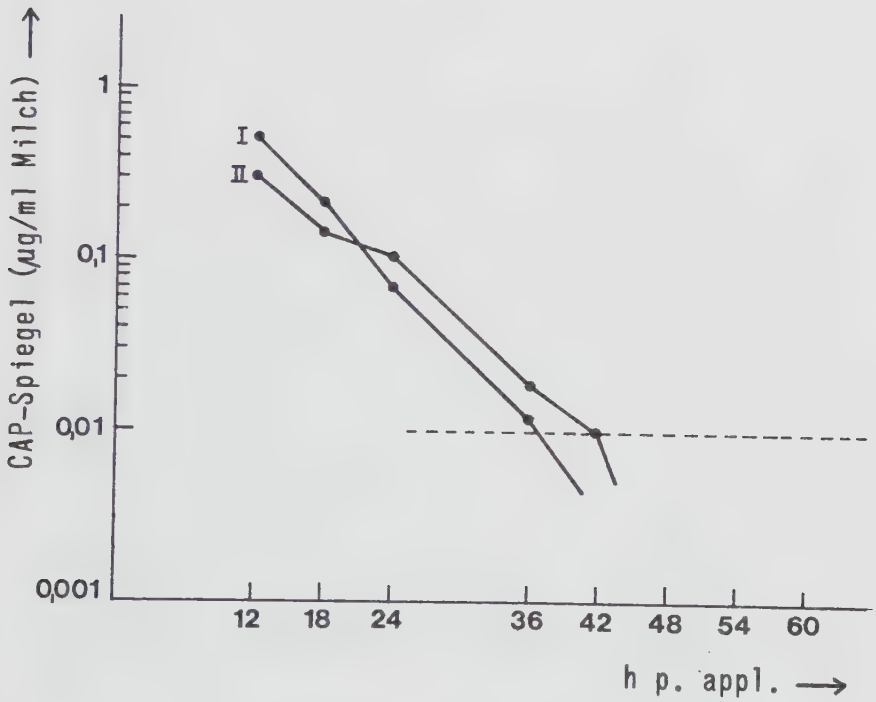


Abb. 6: Ausscheidung von Chloramphenicol mit der Milch nach intramuskulärer Verabreichung (Dosis: 5 g CAP pro Kuh)

3.3.9 A u s s c h e i d u n g v o n C h l o r a m - p h e n i c o l m i t d e r M i l c h n a c h i n t r a z i s t e r n a l e r A p p l i k a t i o n

Die Ausscheidung von CAP mit der Milch nach intrazisternaler Verabreichung wurde bei drei Kühen verfolgt. Zur Feststellung, ob und in welchem Umfang ein Übergang von CAP in nicht behandelte Euterviertel stattfindet, wurde jedes einzelne Viertelgemelk analysiert. Die Untersuchung ergab, daß schon 4-6 Stunden nach der Behandlung meßbare Ausscheidungskonzentrationen in der Milch benachbarter Euterviertel nachweisbar sind, die nach der 8. Stunde p.appl. kontinuierlich abnehmen. Während die jeweilige Ausscheidungs menge aus den beiden unbehandelten Vierteln im wesentlichen übereinstimmte, differierten die Ausscheidungskonzentrationen aus den behandelten Vierteln stark. Auch zwischen den einzelnen Versuchskühen traten Unterschiede auf. Die höchste Ausscheidung aus einem behandelten Viertel war 596,7 µg/ml und die niedrigste 63,2 µg/ml, jeweils vier Stunden nach der Verabreichung. Die Anwendung von zwei verschiedenen Präparaten hatte keinen Einfluß auf die Ausscheidungs menge und die Ausscheidungs dauer. Bei zwei Kühen konnten 24 Stunden nach der Behandlung in keinem Viertelgemelk CAP-Rückstände nachgewiesen werden, bei der dritten Kuh war die Ausscheidung 36 Stunden p.appl. beendet. Die Ergebnisse dieses Ausscheidungsversuchs sind in Tab. 4 zusammengestellt. Die Abb. 7, 8 und 9 veranschaulichen den Ausscheidungsverlauf.

In Abb. 10 ist beispielhaft das Chromatogramm eines Milchextrakts von Versuchskuh Nr. V, der 63,2 µg/ml CAP enthält, dargestellt. Abb. 11 zeigt das Chromatogramm von zwei Milchextrakten der gleichen Kuh, die 2,54 bzw. 5,76 µg/ml CAP enthalten. Abb. 12 zeigt das Chromatogramm von zwei Milchextrakten, die 0,05 µg/ml bzw. 0,06 µg/ml CAP enthalten.

Tabelle 4

CAP-Konzentrationen in der Milch nach intrazisternaler Applikation von Chloramphenicol

Kuh Nr.	Euter- viertel	Ko	µg CAP/ml Milch							
			Stunden p.appl.							
			4	6	8	10	12	24	36	
III*	A	n.n.	74,70	5,84	0,41	0,14	0,10	n.n.	n.n.	
	B	n.n.	0,22	0,09	0,06	0,02	n.n.	n.n.	n.n.	
	C	n.n.	0,36	0,11	0,06	0,09	0,03	n.n.	n.n.	
	D	n.n.	67,70	15,80	5,30	1,29	0,15	n.n.	n.n.	
IV*	A	n.n.	596,70	266,10	64,92	22,58	5,41	0,01	n.n.	
	B	n.n.	0,82	n.u.	n.u.	n.u.	n.u.	n.n.	n.n.	
	C	n.n.	0,97	1,21	0,52	0,40	0,11	n.n.	n.n.	
	D	n.n.	184,50	51,90	12,20	5,78	1,07	0,01	n.n.	
V**	A	n.n.	287,30	33,35	2,54	0,48	0,06	n.n.	n.n.	
	B	n.n.	0,69	0,70	0,28	0,16	0,05	n.n.	n.n.	
	C	n.n.	0,95	0,69	0,25	0,12	0,06	n.n.	n.n.	
	D	n.n.	63,20	37,65	5,76	2,24	0,05	n.n.	n.n.	

* Chloromycetin (PARKE DAVIS, München); Dosis: je 1000 mg CAP in A und D

** Entamydol^R (BOEHRINGER, Ingelheim); Dosis: je 1 Injektorinhalt in A und D = 1000 mg CAP

n.n. = nicht nachweisbar

n.u. = nicht untersucht

Ko = Kontrolle

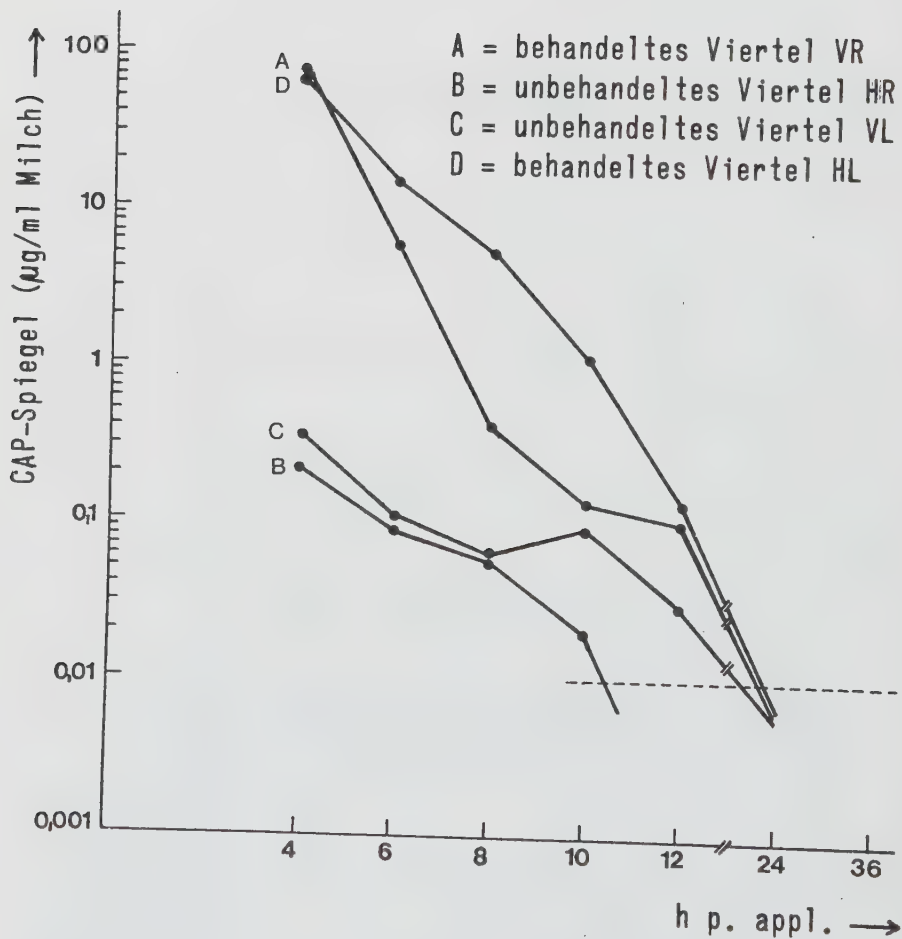


Abb. 7: Ausscheidung von Chloramphenicol in Viertelgemelken einer Kuh nach intrazisternaler Verabreichung (Dosis: 1 g CAP pro Euterviertel)

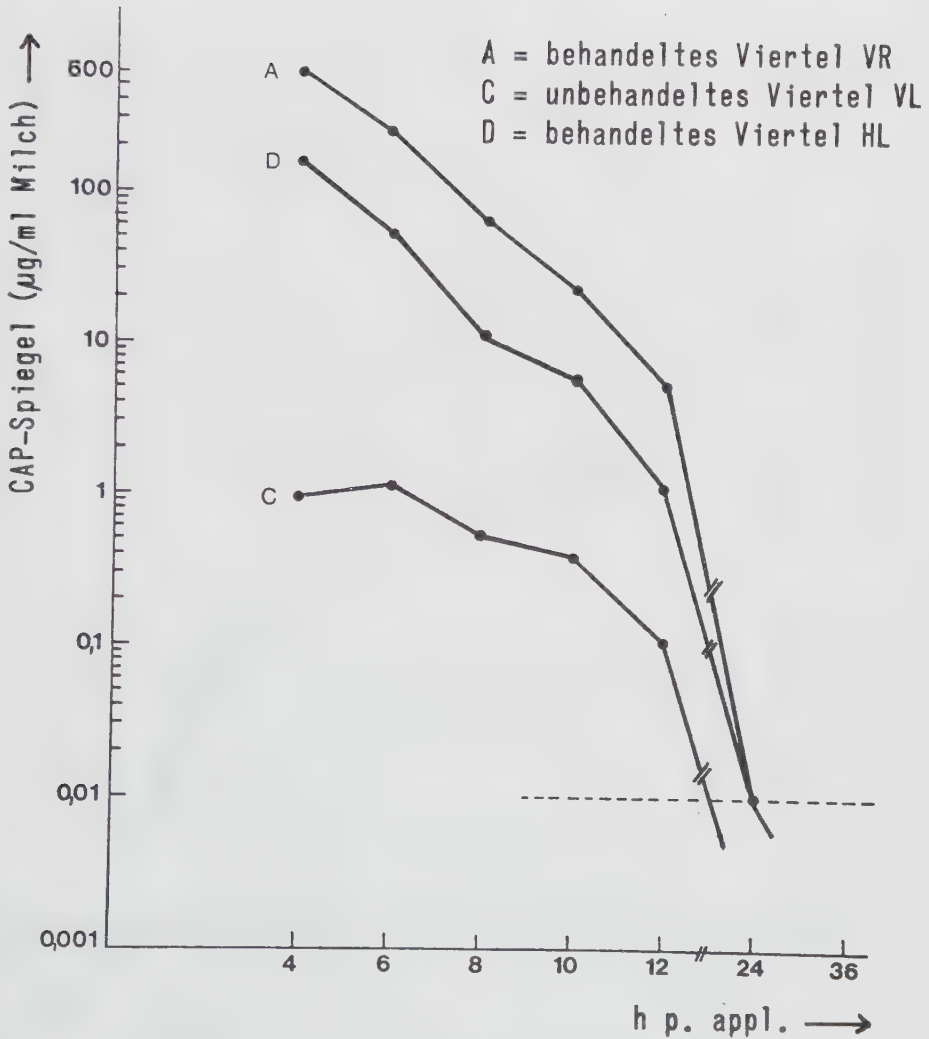


Abb. 8: Ausscheidung von Chloramphenicol in Viertelgemelken einer Kuh nach intrazisternaler Verabreichung (Dosis: 1 g CAP pro Euterviertel)

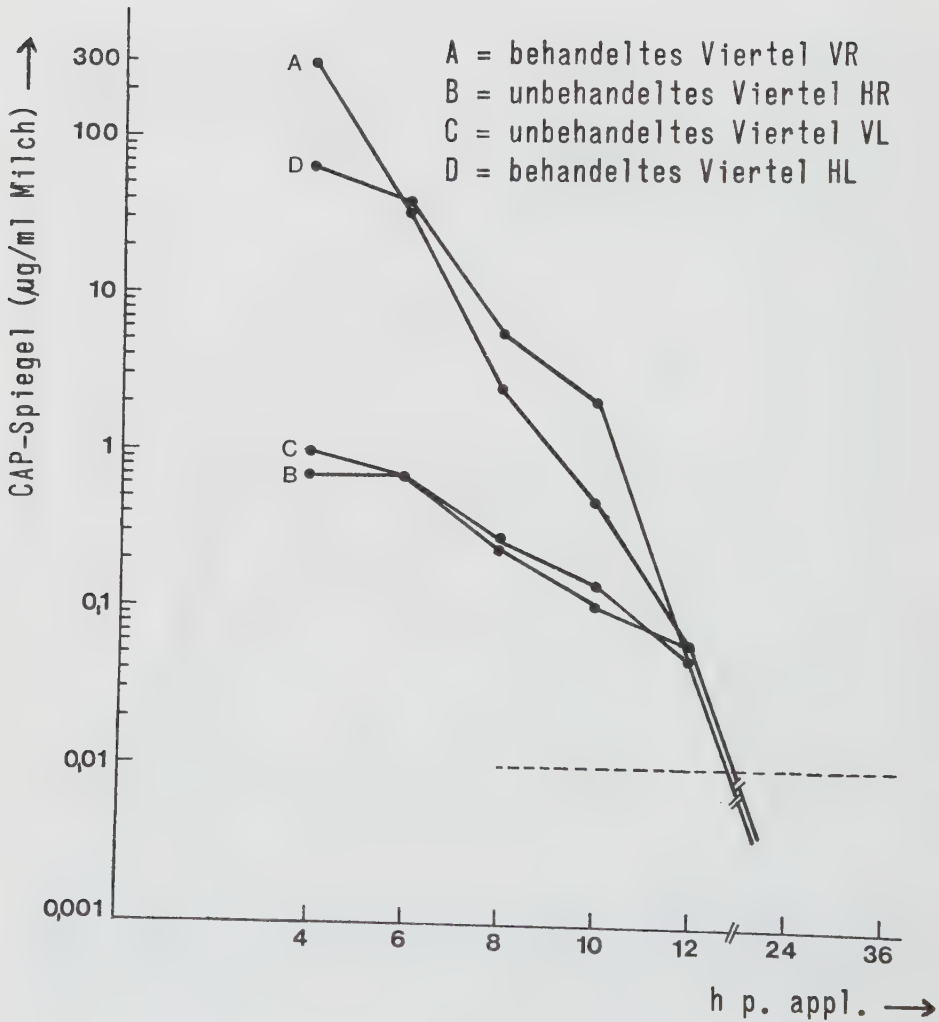


Abb. 9: Ausscheidung von Chloramphenicol in Viertelgemelken einer Kuh nach interazisternaler Verabreichung (Dosis: 1 g CAP pro Euterviertel)

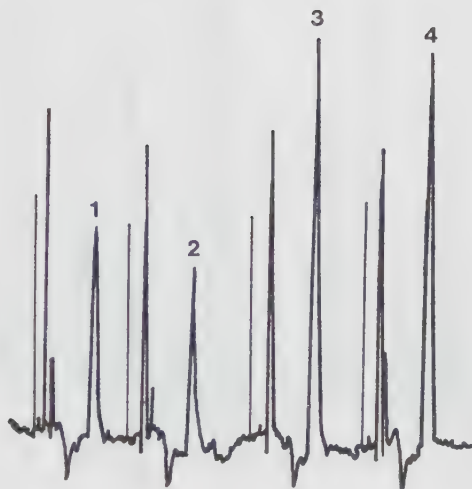


Abb. 10: Chromatogramm von CAP aus Milchproben eines behandelten Euterviertels (4 Std. p. appl.; intrazisternale Verabreichung von 1 g CAP)

Zeichenerklärung:

- 1 = Probenextrakt, Injektion 5 μ l
- 2 = Eichlösung: 2 μ l = 0,2 μ g CAP
- 3 = Probenextrakt, Injektion 10 μ l
- 4 = Eichlösung: 4 μ l = 0,4 μ g CAP

HPLC-Bedingungen

Wellenlänge: 280 nm

Empfindlichkeit: 0,02 AUFS

Elutionsmittel: Wasser/Methanol (60/40)

Durchflußrate: 1 ml/min

Retentionszeit: 7,2 min

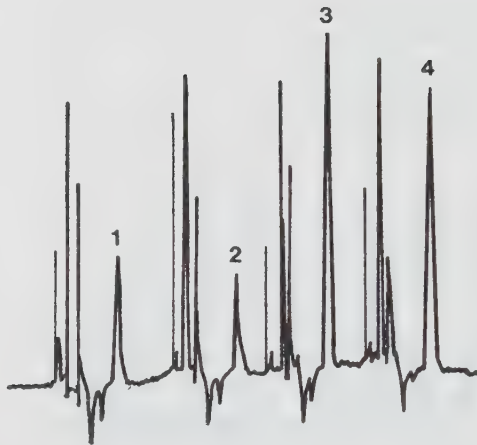


Abb. 11: Chromatogramm von CAP aus Milchproben von zwei behandelten Eutervierteln (8 Std.p.appl.; intrazisternale Verabreichung von je 1 g CAP)

Zeichenerklärung:

- 1 = Probenextrakt aus Euterviertel A, Injektion 10 μ l
- 2 = Eichlösung: 10 μ l = 0,1 μ g CAP
- 3 = Probenextrakt aus Euterviertel D, Injektion 10 μ l
- 4 = Eichlösung: 3 μ l = 0,3 μ g CAP

HPLC-Bedingungen

Wellenlänge: 280 nm

Empfindlichkeit: 0,02 AUFS

Elutionsmittel: Wasser/Methanol (60/40)

Durchflußrate: 1 ml/min

Retentionszeit: 7,2 min

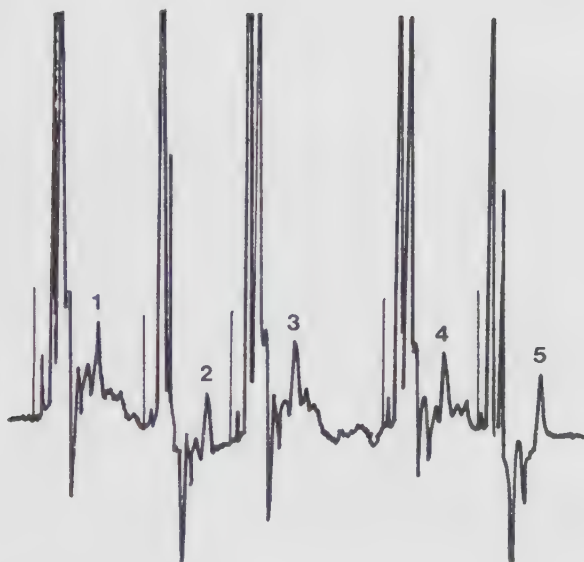


Abb. 12: Chromatogramm von CAP aus Milchproben von zwei unbehandelten Eutervierteln (12 Std. p. appl.; intrazisternale Verabreichung von je 1 g CAP in die beiden anderen Viertel)

Zeichenerklärung:

- 1 = Probenextrakt aus Euterviertel B, Injektion 10 μ l
- 2 = Eichlösung: 3 μ l = 0,03 μ g CAP
- 3 = Probenextrakt aus Euterviertel B, Injektion 10 μ l
- 4 = Probenextrakt aus Euterviertel C, Injektion 10 μ l
- 5 = Eichlösung: 3 μ l = 0,03 μ g CAP

HPLC-Bedingungen

Wellenlänge: 254 nm

Empfindlichkeit: 0,02 AUFS

Elutionsmittel: Wasser/Methanol (60/40)

Durchflußrate: 1 ml/min

Retentionszeit: 7,2 min

3.3.10 Ausscheidung von Chloramphenicol mit der Milch nach intrauteriner Applikation

Die Ausscheidungsverhältnisse von CAP mit der Milch nach intrauteriner Applikation wurden bei drei Kühen untersucht, die sechs bis acht Wochen vor der Behandlung gekalbt hatten. Acht Stunden nach der Behandlung mit je 1000 mg Entamydol^R konnten in der Milch aller drei Kühe und in den einzelnen Viertelmilchmelken in etwa gleiche CAP-Konzentrationen von 0,011 — 0,014 µg/ml ermittelt werden. 22 Stunden p.appl. waren keine CAP-Rückstände in der Milch nachweisbar. Die einzelnen Werte sind in Tab. 5 dargestellt.

Tabelle 5

Ausscheidung von Chloramphenicol mit der Milch nach intrauteriner Applikation

Kuh Nr.	Euterviertel	CAP-Konzentrationen (µg/ml Milch)		
		Ko	Std. p.appl.*	
			8	22
VI	A	n.n.	0,014	n.n.
	B	n.n.	0,011	n.n.
	C	n.n.	0,012	n.n.
	D	n.n.	0,012	n.n.
VII	A	n.n.	0,012	n.n.
	B	n.n.	0,014	n.n.
	C	n.n.	0,012	n.n.
	D	n.n.	0,011	n.n.
VIII	A	n.n.	0,013	n.n.
	B	n.n.	0,011	n.n.
	C	n.n.	n.n.	n.n.
	D	n.n.	0,011	n.n.

* Entamydol^R (BOEHRINGER, Ingelheim); Dosis: 1 Injektorinhalt pro Tier = 1000 mg CAP

n.n. = nicht nachweisbar

3.3.11 Ergebnisse der Kontrolluntersuchung

Erwartungsgemäß konnte in keiner der insgesamt 26 untersuchten Kontrollmilchproben, die vor jeder Behandlung er-
molken wurden, CAP-Rückstände nachgewiesen werden. Auch
im Chromatogramm von Extrakten aus den neun Tankmilchproben
erschieden im Bereich der Retentionszeit von CAP keinerlei
interferierende Peaks.

4. DISKUSSION

Für den Nachweis von CAP in Milch erbringt die Untersuchung mittels HPLC beachtliche Vorteile, da es sich bei diesem Verfahren um eine genügend empfindliche, sehr spezifische, und dabei nicht zu aufwendige Methode handelt. Andere Methoden, z.B. Gaschromatographie, sind wesentlich aufwendigere Verfahren. Zu Beginn dieser Untersuchungen lag eine von WAL et al. (1980) entwickelte HPLC-Methode vor. Es war naheliegend, diese Methode als Grundlage für die Untersuchungen heranzuziehen. Bei der Überprüfung der Methode von WAL et al. konnten Verbesserungen in verschiedener Richtung erreicht werden. WAL et al. gaben Wiederfindungsraten von 68% - 104% an, die bei den eigenen Untersuchungen nicht erreicht werden konnten. Die Wiederfindungsraten lagen hier nur bei 45% - 60%. Durch Änderungen im Extraktionsverfahren konnten die Wiederfindungsraten auf 85% - 101% erhöht werden. Bei neueren Untersuchungen über CAP-Rückstände in der Milch mit HPLC wurden Ausbeuten von über 90% erreicht (PETZ, 1983). LEE (1981) erzielte Wiederfindungsraten von 83% - 85%.

Neben der Verbesserung der Wiederfindungsraten wurde auch eine erhebliche Zeitersparnis erreicht, während die durch die Modifikation erzielte Ersparnis von Materialien als gering zu veranschlagen ist. Der notwendige Zeitaufwand ist so bemessen, daß von einer routinemäßig durchführbaren Methode gesprochen werden kann. Ein limitierender Faktor ist die Messung am Chromatographen selbst, da hier Retentionszeiten von 7 - 11 Minuten eingeplant werden müssen.

Die Modifikation der Originalmethode von WAL et al. erfolgte nicht nur durch die beschriebenen Änderungen des Extraktionsverfahrens bei künstlich kontaminierter Milch, sondern auch durch Verbesserung der HPLC-Bedingungen. So ergab sich eine Opti-

mierung der Ergebnisse durch die Wahl der Wellenlänge des UV-Detektors von 254 nm gegenüber der von WAL et al. benutzten Wellenlänge von 280 nm. Kleinere Veränderungen wurden bei der mobilen Phase und der Empfindlichkeit vorgenommen. Bei der angewendeten Wellenlänge von 254 nm wurden im Chromatogramm um etwa 65% höhere Signale erreicht als bei 280 nm. Bei der Wellenlänge von 254 nm traten auch keinerlei interferierende Peaks im Chromatogramm auf. Durch die Umstellung der Wellenlänge wurden keinerlei Nachteile beobachtet. Vor allem war kein Verlust der Spezifität erkennbar.

Die erreichte Nachweisgrenze für CAP in der Milch von 0,01 µg/ml im Rahmen von Routineuntersuchungen muß als gut angesehen werden. Auch die in letzter Zeit vorgelegte HPLC-Methode von PETZ (1983) wies keine niedrigere Nachweisgrenze auf. Neben einer guten Wiederfindungsrate wurde hier eine Nachweisgrenze von 0,02 µg CAP/ml Milch angegeben.

Die beste Kontrolle der Spezifität wird durch die Massenspektrometrie erreicht. Bei den eigenen Untersuchungen wurde diese Methode nicht angewendet, sondern in allen Zweifelsfällen den Proben abgestufte CAP-Mengen zugesetzt, um aus dem resultierenden Peak die Zuordnung zu CAP zu erkennen.

Die modifizierte Methode wurde nicht nur an künstlich kontaminierter Milch erprobt, sondern auch im Rahmen von Ausscheidungsversuchen beim Rind. Bei den Versuchen zur Verfolgung der Ausscheidung von CAP mit der Milch nach intramuskulärer Verabreichung ergab sich unter den gegebenen Bedingungen (Dosis: 5 g CAP pro Tier) und Verwendung von einer wäßrigen Zubereitung von CAP (Chloroject L^R, TAD, Cuxhaven) wie erwartet eine schnelle Ausscheidung des Wirkstoffs. Bereits 48 Stunden nach der Applikation konnte CAP nicht mehr nachgewiesen werden. DE CORTE-BAETEN und DEBACKERE (1976) sowie SISODIA et al. (1973 a) stellten nach intramuskulärer Gabe entsprechender Dosen CAP noch kürzere Ausscheidungszeiten fest. 24 Stunden p.appl. waren nur noch Spuren

von CAP, 36 Stunden danach keine CAP-Rückstände mehr nachweisbar. Allerdings lagen die Nachweisgrenzen höher, nämlich bei 0,1 µg/ml. JACOBS und HANSELAAR (1966) konnten bei einer Erfassungsgrenze von 1 µg/ml schon sechs Stunden p.appl. keine Rückstände in der Milch finden. Nach ZIV et al. (1973) ist die Ausscheidungsdauer bei höherer Dosierung verlängert. Auch die pharmazeutische Zubereitung beeinflusste die Dauer der Elimination. 34 Stunden nach Verabreichung einer enorm hohen Dosis, nämlich 25 g CAP-Base und CAP-Ester, waren in der Milch noch CAP-Gehalte von 1,0 bzw. 0,5 µg/ml. Insgesamt gesehen ergaben sich geringe Unterschiede in der Ausscheidung von CAP nach intramuskulärer Verabreichung.

Weit kürzere Ausscheidungszeiten wurden bei der intrazisternalen Applikation von CAP ermittelt. Die Untersuchungen wurden an Viertelgemelken durchgeführt, wobei bereits 36 Stunden p.appl. in keinem Falle mehr CAP nachweisbar war. Naturgemäß traten hohe Initialmilchspiegel auf. Diese Befunde entsprechen den Beobachtungen anderer Untersucher (HAMANN, 1973; NOUWS und ZIV, 1982). Auch in den unbehandelten Eutervierteln wurde erwartungsgemäß CAP nachgewiesen. Es war jedoch überraschend, daß selbst bei niedrigen CAP-Spiegeln in der Milch aus behandelten Eutervierteln noch Rückstände in den unbehandelten Eutervierteln gefunden werden konnten. Dies entspricht jedoch den Ergebnissen von LEE (1981), der nach Instillation von 5 g CAP in ein Euterviertel 18 Stunden p.appl. etwa gleiche Konzentrationen in der Milch aus behandelten und unbehandelten Eutervierteln feststellte, die den Blutkonzentrationen entsprachen. Auch NOUWS und ZIV (1982) bestätigten die lange Anwesenheit von Rückständen in unbehandelten Eutervierteln. Für CAP ist der schnelle und umfangreiche Übergang von der Milch in das Blut und umgekehrt bekannt (ZIV und SULMANN, 1975; NOUWS und ZIV, 1982). Die Resorption von CAP aus dem Euter ist fast vollständig (LEE, 1981).

Die kürzesten Ausscheidungszeiten wurden nach der intrauterinen Verabreichung von CAP beobachtet. Acht Stunden nach der Applikation von 1 g CAP konnten nur noch geringe, an der Nachweisgrenze für CAP liegende Spiegel beobachtet werden. 22 Stunden p.appl. waren keine Rückstände mehr nachweisbar. Die Ergebnisse anderer Autoren differierten in dieser Hinsicht (GEDEK et al., 1975 a, 1975 b; BLACK et al., 1979; GERULL, 1981). Ein Vergleich der vorgelegten Untersuchungsergebnisse mit denen der anderen Untersucher ist jedoch nicht möglich, da entweder große Unterschiede in der Nachweisempfindlichkeit (GEDEK et al., 1975 a, 1975 b; BLACK et al., 1979) oder in der Dosis bzw. in der pharmazeutischen Zubereitung des intrauterin verabreichten Arzneimittels (GERULL, 1981) bestanden. Aus diesen unterschiedlichen Versuchsbedingungen erklären sich auch die abweichenden Aussagen über den Nachweis von CAP.

5. Z U S A M M E N F A S S U N G

1. Es wurden Versuche durchgeführt, um Chloramphenicol-Rückstände in der Milch mittels Hochdruckflüssigkeitschromatographie (HPLC) zu erfassen. Ausgehend von der Methode von WAL et al. (1980) wurden durch Modifikation des Reinigungsverfahrens bei der Extraktion von CAP aus Milch und der HPLC-Bedingungen Verbesserungen der Ergebnisse erzielt. Die Extraktion von CAP aus der biologischen Matrix erfolgte mit Ethylacetat, der in Acetonitril gelöste Rückstand wurde mit iso-Octan gereinigt. Damit wurde ein nahezu fettfreier Extrakt erhalten, der weitere Reinigungsschritte ersparte. In keinem Fall konnten störende Peaks im Bereich der Retentionszeit von CAP festgestellt werden. Zur HPLC-Analyse wurde eine handelsübliche Trennsäule mit Nucleosil^R RP C₁₈ der Korngröße 5 µm verwendet. Durch Einstellung des UV-Detektors auf die Wellenlänge von 254 nm anstelle von 280 nm wurden im Chromatogramm um etwa 65% höhere Signale erreicht. Die Wiederfindungsrate lag zwischen 85% und 101%. Die Erfassungsgrenze von CAP in Milch betrug 0,01 µg/ml. Aufgrund des erforderlichen Material- und Zeitaufwandes kann die Methode als zur Routine geeignet angesehen werden.
2. Nach intramuskulärer Verabreichung von CAP an zwei Milchkühe konnten die vergleichsweise längsten Ausscheidungszeiten mit 42 Stunden ermittelt werden. Für die Versuche wurde eine wässrige Zubereitung von CAP in einer Dosis von 5 g pro Tier verwendet.

3. Nach intrazisternaler Verabreichung von CAP an drei Milchkühe ergaben sich Ausscheidungszeiten von 24 bzw. 36 Stunden, wobei in der Milch aus nicht behandelten Eutervierteln CAP-Rückstände in fast der gleichen Höhe und der gleichen Zeitdauer nachgewiesen werden konnten wie in der Milch aus behandelten Eutervierteln. Die in jeweils zwei diagonal gelegene Euterviertel verabreichte Dosis pro Viertel betrug 1 g CAP. Sehr hohe Initialspiegel in den behandelten Eutervierteln bei sehr schnellem Abfall innerhalb sehr kurzer Zeit wurden beobachtet.
4. Die vergleichsweise kürzesten und niedrigsten CAP-Spiegel in der Milch wurden nach intrauteriner Verabreichung ermittelt. Die angewendete Dosis betrug 1 g CAP pro Tier. Bereits acht Stunden p.appl. konnten nur noch CAP-Konzentrationen im Bereich der Nachweisgrenze ermittelt werden.
5. Anhand von Milchproben, die mit β -Glucuronidase inkubiert wurden, konnte festgestellt werden, daß nach intramuskulärer Verabreichung von CAP kein glucuronidiertes CAP im meßbaren Bereich in die Milch gelangt.
6. Bei Versuchen mit sieben antimikrobiell wirksamen Substanzen konnten weder bei der Wellenlänge von 254 nm noch bei 280 nm Interferenzen mit CAP im Chromatogramm festgestellt werden. Auch die Extrakte von Kontrollmilchproben erzeugten keine Signale im Bereich der Retentionszeit von CAP.

5. SUMMARY

DETECTION OF CHLORAMPHENICOL-RESIDUES IN COW'S MILK BY MEANS OF HIGH-PRESSURE LIQUID CHROMATOGRAPHY

1. Tests were carried out, in order to detect chloramphenicol-residues in the milk by means of high-pressure liquid chromatography. Basing on the method of WAL et al. (1980), improved results were obtained by modifying the clean-up procedure at the extraction of chloramphenicol-residues from the milk as well as the high-pressure liquid chromatography conditions. The extraction of chloramphenicol from the biological structure was made by means of ethyl acetate. The residue dissolved in acetonitrile was cleaned by means of isooctane. An almost grease-free extract, which obviated further cleaning measures, was obtained in this way. Interfering peaks within the retention time of chloramphenicol were not detected in none of the cases. A commercially available separation column with Nucleosil^R RP C₁₈ of the grain size 5 µm was used for the high-pressure liquid chromatography. By adjusting the ultraviolet detector to the wave length 254 nm instead of 280 nm signals superior by about 65% were attained in the chromatogram. The recovery rate ranged between 85% and 101%. The limit of detectability of chloramphenicol in the milk was 0,01 µg/ml. Regarding the required expenditure of material and time the method may be considered as routine appropriate.
2. The comparatively longest elimination times, namely 42 hours, could be stated after intramuscular administration of chloramphenicol to two dairy cows. An aqueous preparation of chloramphenicol in a dose of 5 g per animal was applied with the tests.

3. Elimination times of 24 hours respectively 36 hours resulted after intramammary administration of chloramphenicol to three dairy cows, whereby in the milk from untreated udder quarters chloramphenicol-residues were found to be present in the milk almost equalling in amount and duration those in the milk from treated udder quarters. The dose administered in each case to two diagonally positioned udder quarters was 1 g chloramphenicol per quarter. Very high initial levels in the treated udder quarters with a quick decrease within a very short time were found hereby.
4. The comparatively shortest and lowest chloramphenicol levels in the milk were found after intrauterine administration. The applied dose was 1 g chloramphenicol per cow. Already after eight hours after treatment, only chloramphenicol concentrations within the range of the detection limit could be found to be present in the milk.
5. By means of milk samples, which had been incubated with β -glucuronidase, it could be found that, after intramuscular injection of chloramphenicol within measurable range, no glucuronidized chloramphenicol gets into the milk.
6. On tests with seven antimicrobically effective substances, no interferences with chloramphenicol in the chromatogram could be detected neither with the wave length of 254 nm nor with the wave length of 280 nm. The extracts of control milk samples, too, did not provoke any signals within the range of retention time of chloramphenicol.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

- ALESSANDRO, A. (1963) Antibiotics in milk.
Boll.Lab.Chim.Provinciali
(Bologna) 14, 355-365
- ARAVIND, M.K. (1980) Simultaneous measurement
MICELI, J.N. of chloramphenicol and chlor-
KAUFFMAN, R.E. amphenicol succinate by high-
STREBEL, L.E. performance liquid chromato-
DONE, A.K. graphy.
J.Chromatogr. 221, 176-181
- BACKER, P. de (1978) Plasma levels of chlorampheni-
DEBACKERE, M. col after oral administration
CORTE-BAETEN, K. de in calves during the first weeks
of life.
J.Vet.Pharmacol.Ther. 1, 135-140
- BENNEKOM, W.P. van (1977) High-performance pulse and
SCHUTE, J.B. differential pulse polarography.
Part I. Theoretical considerations.
Anal.Chim.Acta 89, 71-82
- BLACK, W.D. (1979) A study of drug residues in
MACKAY, A.L. milk following intrauterine
DOIG, P.A. infusion of antibacterial drugs
CLAXTON, M.J. in lactating cows.
Can.Vet.J. 20, 354-357
- BOSSUYT, R. (1976) Identification of antibiotic
RENTERGHEM, R. van residues in milk by thin-
WAES, G. layer chromatography.
J.Chromatogr. 124, 37-42

- BRUNSCHWILER, F. (1961) Die Ausscheidungsdauer verschiedener Antibiotika bei intramammärer Behandlung des Rindes.
Schweiz.Arch.Tierheilk.
103, 595-609
- BURKE, J.T. (1980) High-pressure liquid chromatographic assay for chloramphenicol, chloramphenicol-3-monosuccinate, and chloramphenicol-1-monosuccinate.
J.Pharm.Sci. 69, 909-912
- WARGIN, W.A.
BLUM, M.R.
- CORTE-BAETEN, K.de (1975) Chloramphenicol plasma levels in horses, cattle and sheep after oral and intramuscular administration.
Zbl.Vet.Med. 22, 704-712
- DEBACKERE, M.
- CORTE-BAETEN, K.de (1976) Ausscheidung von Chloramphenicol in der Milch nach oraler und parenteraler Applikation bei laktierenden Rindern.
Dt.tierärztl.Wschr. 83, 231.233
- DEBACKERE, M.
- CORTE-BAETEN, K. de (1978) The non-absorption of chloramphenicol after oral administration in adult ruminants; a tentative explanation from in vitro studies.
J.Vet.Pharmacol.Ther. 1, 129-134

- CRECHIOLO, J.
HILL, R.E. (1979) Determination of serum chloramphenicol by high-performance liquid chromatography. J.Chromatogr. 162, 480-484
- DAVIS, L.E.
NEFF, C.A.
BAGGOT, J.D.
POWERS, T.E. (1972) Pharmacokinetics of chloramphenicol in domesticated animals. Am.J.Vet.Res. 33, 2259-2266
- EADS, F.E. (1954) Chloromycetin ointment veterinary, retention in cow's milk. Veterinary Sales, Nov.10
- FOSSDAL, K.
JACOBSEN, E. (1971) Polarographic determination of chloramphenicol. Anal.Chim.Acta 56, 105-115
- GAL, J.
MARCELL, P.D.
TATSCIO, C.M. (1980) High-performance liquid chromatographic micro-assay for chloramphenicol in human blood plasma and cerebrospinal fluid. J.Chromatogr. 181, 123-126
- GEDEK, W. (1973) Ausscheidung von Antibiotika mit der Milch. Tierärztl.Prax. 1, 245-251

- GEDEK, W. (1975 a) Antibiotika-Milchspiegel-
FASTNER, S. bestimmung beim Rind nach
GÜNZLER, O. intrauteriner Verabreichung
handelsüblicher Pharmaka.
Tierärztl.Umsch. 30, 223-227
- GEDEK, W. (1975 b) Rückstände in Milch, Blut-
MATZKE, P. serum und Harn nach intra-
FASTNER, S. uteriner Verabreichung von
HOLLWICH, W. Antibiotika-Handelspräparaten
an Puerperalkühe.
Tierärztl.Umsch. 30, 504-508
- GERULL, A. (1981) Nachweis von Chloramphenicol
in Lebensmitteln tierischer
Herkunft.
Diss., Berlin
- GLAZKO, A.J. (1949 a) Biochemical studies on chlor-
WOLF, L.M. amphenicol (chloromycetin)
DILL, W.A. I. Colorimetric methods for
the determination of chlor-
amphenicol and related nitro
compounds.
Arch.Biochem. 23, 411-418
- GLAZKO, A.J. (1949 b) Biochemical studies on chlor-
WOLF, L.M. amphenicol (chloromycetin)
DILL, W.A. II. Tissue distribution
BRATTON, A.C. and excretion studies.
J.Pharmacol.Exper.Ther. 96,
445-459

- GLAZKO, A.J. (1966) Identification of chlor-
amphenicol metabolites and
some factors affecting meta-
bolic disposition.
Antimicrob.Ag.Chemother. 655-665
- GORZELEWSKA, K. (1961) Studies to establish the
dosage of chloromycetin
JUSZKIEWICZ, T. (chloramphenicol) for domestic
animals by means of serum and
milk levels determinations.
Biul.Inst.Weteryn.Pulawy 5, 2-3
- HAMANN, J. (1973) Über Nachweis und Bedeutung
von Antibiotika-Rückständen
in der Milch unter besonderer
Berücksichtigung der Isolierung
und Identifizierung von Chlor-
amphenicol und Isoxazolyl-
penicillinen.
Vet.Diss., Hannover
- HAMANN, J. (1980) Untersuchungen über Nachweis,
HEESCHEN, W. Isolierung und Identifizierung
TOLLE, A. von Antibiotika-Rückständen in
der Milch.
Milchwissensch. 35, 544-546
- HESS, G.B. (1950) Polarographic estimation of
chloramphenicol.
Anal.Chem. 22, 649-651

- HOLLSTEIN, E.
LAUE, W.
ZAPFF, G.
- (1981) Gaschromatographische Bestimmung von Chloramphenicol-Rückständen in tierischem Material.
Nahrung 25, 143-149
- HOLTMANNSPOTTER, H.
THIER, H.-P.
- (1982) Analysenmethode für Rückstände von sechs Sulfonamiden und Chloramphenicol durch Gaschromatographie an Glaskapillaren.
Dt.Lebensm.Rundsch. 78, 347-350
- JACOBS, J.
HANSELAAR, J.
- (1966) Antibiotic residues in milk of cows after parenteral administration.
Tijdschr.Diergeneesk 91, 648-657
- JOHANNES, B.
KÖRFER, K.-H.
SCHAD, J.
ULBRICH, I.
- (1983) Bestimmung von Chloramphenicol-Rückständen in eßbaren Geweben.
Arch.Lebensmittelhyg. 34, 1-7
- KARLOWSKI, K.
- (1976) Gas-chromatographic determination of chloramphenicol residues in milk.
Roczn.Panstw.Zakl.Hig. 27, 629-633

- KOUP, J.R. (1978) High-performance liquid
BRODSKY, B. chromatographic assay of
LAU, A. chloramphenicol in serum.
BEAM, J.R. Antimicrob.Ag.Chemother. 14,
439-443
- KRAACK, J. (1967) Brillantschwarz-Reduktions-
TOLLE, A. test mit Bac.stearothermo-
philus var. calidolactis
zum Nachweis von Hemmstoffen
in der Milch.
Milchwissensch. 22, 669-673
- KUTTER, R. (1982) Nachweis und Bestimmung von
JAHR, D. Chloramphenicol mit HPLC und
STRITZINGER, H. GC/MS.
Fleischwirtsch. 62, 515-516
- LAIK ALI, S. (1978) Separation and determination
of the hydrolysis products of
chloramphenicol in pharma-
ceutical preparations by high-
performance liquid chromato-
graphy.
J.Chromatogr. 158, 103-105
- LAUE, W. (1980) Bioverfügbarkeit von Chlor-
HOLLSTEIN, E. amphenicol nach subkutaner
ZAPFF, G. Applikation und Ausscheidung
mit der Milch bei Kühen.
Mh.Vet.Med. 35, 344-346

- LEBELLE, M.J.
YOUNG, D.C.
GRAHAM, K.C.
WILSON, W.L.
- (1979) High-performance liquid chromatographic determination of chloramphenicol and 2-amino-1 (p-nitro-phenyl) -1,3-propanediol in pharmaceutical formulations. J.Chromatogr. 170, 282-287
- LEE, J.J. van der
BENNEKOM, W.P. van
JONG, J.J. de
- (1980) Determination of chloramphenicol at ultra-trace levels by high-performance differential pulse polarography. Application to milk and meat. Anal.Chim.Acta 117, 171-182
- LEE, J.J. van der
- (1981) Determination of chloramphenicol and its application to residues in milk and in dairy cows. Thesis, Leiden
- MACHEREY-NAGEL
- (1982) HPLC - Hochleistungs-Flüssigkeits-Chromatographie Firmenschrift Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren
- MEYER, V.
- (1980) Praxis der Hochleistungsflüssigkeitschromatographie. Verl.Moritz Diesterweg, Frankfurt a.M., Berlin, München, 2.Aufl.
- MOORE, W.J.
HUMMEL, D.O.
- (1973) Physikalische Chemie Verl.Walter de Gruyter, Berlin-New York

- NILSSON-EHLE, J.
KAHLMETER, G.
NILSSON-EHLE, P.
- (1978) Determination of chloramphenicol in serum and cerebrospinal fluid with high-pressure liquid chromatography. J.Antimicrob.Chemother. 4, 169-176
- NOUWS, J.F.M.
ZIV, G.
- (1978) A study of chloramphenicol distribution and residues in dairy cows. Tijdschr.Diergeneesk. 103, 63-72
- NOUWS, J.F.M.
ZIV, G.
- (1979) Serum chloramphenicol levels and the intramuscular bioavailability of several parenteral formulations of chloramphenicol in ruminants. Vet.Quarterly 1, 47-58
- NOUWS, J.F.M.
ZIV, G.
- (1982) Pharmacological aspects of chloramphenicol administration by the intramammary route to lactating dairy cows. Vet.Quarterly 4, 23-31
- OSEEKEY, K.B.
ROWSE, K.L.
KOSTENBAUDER, H.B.
- (1980) High-performance liquid chromatographic determination of chloramphenicol and its monosuccinate ester in plasma. J.Chromatogr. 182, 459,464

- PENG, G.W. (1978) Rapid and micro high-pressure liquid chromatographic determination of chloramphenicol in plasma.
J.Pharm.Sci. 67, 1036-1038
- GADALLA, M.A.F.
- CHIOU, W.L.
- PETZ, M. (1983) Hochdruckflüssigkeitschromatographische Rückstandsanalyse von Chloramphenicol, Furazolidon und fünf Sulfonamiden in Eiern, Fleisch und Milch.
Z.Lebensm.Unters.Forsch. 176, 289-293
- PILLOUD, M. (1973) Pharmacokinetics, plasma protein binding and dosage of chloramphenicol in cattle and horses.
Res.Vet.Sci. 15, 231-238
- RÜSSEL, H.A. (1978) Über die Bestimmung von Chloramphenicol in tierischen Geweben durch HPLC.
Chromatographia 11, 341-343
- SAMPLE, R.H.B. (1979) High-pressure liquid chromatographic assay of chloramphenicol in biological fluids.
Antimicrob.Ag.Chemother. 15, 491-493
- GLICK, M.R.
- KLEIMAN, M.B.
- SMITH, J.W.
- OEI, T.O.

- SCHMID, A. (1983) Chloramphenicolrückstände in Lebensmitteln tierischer Herkunft als potentielle Ursache der aplastischen Anämie des Menschen.
Dtsch.tierärztl.Wschr. 90, 201-248
- SISODIA, C.S. (1973 a) Chloramphenicol concentrations
GUPTA, V.S. in blood and milk of cows
DUNLOP, R.H. following parenteral administration.
RADOSTITS, O.M. Can. Vet.J. 14, 217-220
- SISODIA, C.S. (1973 b) A pharmacological study on
DUNLOP, R.H. chloramphenicol in cattle.
GUPTA, V.S. Am.J.Vet.Res. 34, 1147-1151
- TAKESHITA, R. (1972) Detection of chloramphenicol
YAMASHITA, T. in foods by thinlayer chromatography.
J.Hyg.Chem. 18, 56-60
- THIES, R.L. (1978) High-perfomance liquid-chro-
FISCHER, L.J. matographic assay for chlor-
amphenicol in biological fluids.
Clin.Chem. 24, 778-781
- TERPLAN, G. (1967) Zum Vorkommen und Nachweis
ZAADHOF, K.-J. von Hemmstoffen in der Milch -
eine kurze Übersicht.
Milchwissensch. 22, 761-771

- TERPLAN, G. (1979) Seminar in der Milchwissenschaft mit Übungen.
ZAADHOF, K.-J. Teil II
GROVE, H.-H.
- VELAGAPUDI, R. (1982) Simultaneous determination
SMITH, R.V. of chloramphenicol and chlor-
LUDDEN, T.M. amphenicol succinate in plasma
SAGRAVES, R. using high-performance liquid
chromatography.
J.Chromatogr. 228, 423-428
- VIGH, G. (1976) Separation of chloramphenicol
INCZEDY, J. intermediates by high-per-
formance liquid chromatography
on micropac-NH₂ columns.
J.Chromatogr. 129, 81-89
- WAL, J.M. (1978) Dosage sensible et rapide
PELERAN, J.C. du chloramphenicol dans le
BORIES, G. serum par chromatographie
liquide haute pression.
J.Chromatogr. 145, 502-506
- WAL, J.M. (1979) Electron-capture detection of
PELERAN, J.C. chloramphenicol using a hepta-
BORIES, G. fluorbutyrate derivative.
Application to residues in milk.
J.Chromatogr. 168, 179-185
- WAL, J.M. (1980) High Performance Liquid Chro-
PELERAN, J.C. matographic Determination of
BORIES, G. Chloramphenicol in Milk.
J.Assoc.Off.Anal.Chem. 63,
1044-1048

- WALTER, A.M. (1975) Antibiotikafibel
HEILMEYER, L. Verlag Thieme, 4. Aufl.
- ZIV, G. (1973) Blood and milk levels of
BOGIN, E. chloramphenicol in normal
SULMAN, F.G. and mastitis cows and ewes
after intramuscular admini-
stration of chloramphenicol
and chloramphenicol sodium
succinate.
Zbl.Vet.Med. 20, 801-811
- ZIV, G. (1975) Absorption of antibiotics
SULMAN, F.G. by the bovine udder.
J.Dairy Sci. 58, 1637-1644

Es ist mir ein Bedürfnis, Herrn Prof. Dr. Gedek für die Überlassung des Themas und die jederzeit gewährte Hilfe und freundliche Unterstützung bei der Anfertigung der Arbeit herzlich zu danken.

Mein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern des Tiergesundheitsdienstes Bayern in Grub für das jederzeit freundliche Entgegenkommen und ihre stete Hilfsbereitschaft.

L E B E N S L A U F

Am 1. Juni 1952 wurde ich, Renate Lidl, als Tochter des Elektromeisters Anton Lidl und seiner Ehefrau Maria, geb. Schretter, in Murnau geboren.

Nach der Volksschule besuchte ich ab 1963 das Mathematisch-naturwissenschaftliche Gymnasium in Murnau, wo ich 1972 die Reifeprüfung ablegte.

Nach dem Abitur war ich bis 1975 im elterlichen Einzelhandelsgeschäft tätig.

Im Wintersemester 1975 begann ich das Studium der Tiermedizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München, das ich im Frühjahr 1981 mit dem Staatsexamen abschloß. Die Approbation als Tierarzt erhielt ich am 8. Juli 1981.

Im Januar 1982 begann ich beim Tiergesundheitsdienst Bayern mit der Anfertigung der vorliegenden Dissertation.

